

***UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA***  
***FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA***

**Pedro Miguel Leal Rodrigues**

**ESTUDOS ESTRUTURAIS EM FERREDOXINAS  
POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**



Lisboa, 1999

**IMPRESSÃO: C. M. L. L.**

Pedro Miguel Leal Rodrigues

**ESTUDOS ESTRUTURAIS EM FERREDOXINAS  
POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Dissertação apresentada para obtenção do Grau  
de Doutor em Química, especialidade Química  
Inorgânica, pela Universidade Nova de Lisboa,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia.

Lisboa, 1999

- N° de arquivo:

- "Copyright":

**Aos meus pais**

## AGRADECIMENTOS

O trabalho apresentado nesta tese de Doutorado foi realizado no Centro de Química Fina e Biotecnologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Para que fosse possível a sua realização, estiveram envolvidas várias pessoas, nomeadamente colegas, amigos e familiares, bem como algumas outras instituições, a quem gostaria de apresentar o meu profundo agradecimento.

Ao Prof. José Moura, meu orientador gostaria de agradecer em primeiro lugar a honra de me ter deixado trabalhar no seu grupo de investigação e me ter dado a possibilidade de desenvolver numas excepcionais condições todo o trabalho que aqui apresento. Queria também agradecer-lhe a sua amizade e compreensão em todas as situações, nomeadamente nas mais complicadas. Gostaria ainda de referir que o seu espírito dinâmico, a sua capacidade de trabalho, entusiasmo e disponibilidade sempre foram de uma importância vital para a realização deste trabalho, bem como serviram de fonte inspiradora em muitas ocasiões.

À Professora Isabel Moura agradeço todo o interesse demonstrado por este trabalho, realçando a sua imprescindível ajuda tanto em todo o trabalho laboratorial, bem como na discussão dos resultados.

À Professora Anjos Macedo, agradeço quase tudo o que está neste trabalho. A sua ajuda, boa disposição, paciência/impaciência, e atenção constante a todos os estudos realizados. Gostaria de dizer que para mim, desde o início deste trabalho, sempre foi e sempre será "uma Barra do RMN em Sistemas Paramagnéticos".

Ao Professor Frank Rusnak, da Mayo Clinic (Rochester-USA), agradeço a extrema amabilidade com que me recebeu no seu laboratório. Agradeço-lhe ainda as excelentes condições de trabalho que me proporcionou e a sua ajuda na interpretação dos resultados na área da Biologia Molecular.

Ao Dr. Victor Wray, do GBF ( Braunschweig, Alemanha) a sua simpatia, ajuda e disponibilidade em receber-me no seu laboratório, possibilitando-me a utilização de um espectrómetro de RMN de 600MHz.

Ao Professor Vasilius Papaefthymiou, da Universidade de Ioanina (Ioanina, Grécia), o programa simulador do modelo para o estado intermediário da ferredoxina II de *Dg*.

Aos meus colegas, companheiros de trabalho, Filipe Campos (Dept. Física – F.C.T – U.N.L), Brian Goodfellow, Ludwig Krippahl, Carlos Blondino, Nuno Palma e Jorge Caldeira, pela sua ajuda e intervenção directa neste trabalho. Ao Filipe, pela sua ajuda com o programa simulador, ao Brian pelas suas dicas e facilidade em resolver os problemas da "máquina", ao Ludi pela brilhante e eficiente ajuda nas questões informáticas, ao Carlos pela sua disponibilidade em me ajudar na aquisição e tratamento dos espectros de RPE e finalmente ao Nuno e ao Jorge por algumas ideias e discussões.

Um agradecimento muito especial à Dininha e ao Rui, pela boa disposição constante, ajuda e sobretudo por ouvir as minhas lamúrias, e pelos conselhos sempre valiosos nas piores alturas.

Aos meus colegas de grupo, João Almendra, Ana Pamplona, Marta Carepo, Gabriela Almeida, Carla Carneiro, Sofia Nunes, Carla Ascenso, Helder Pinto, Stefan Besson, Fernando Graça, Susana Andrade, Cristina Correia, Miguel Prudêncio, Luís Veloso, João Lima, Mauro Scharf, Adelaide, Teresa, Sergey, Olga, Sofia e Cristina pelo bom ambiente de trabalho, disponibilidade, camaradagem, que fizeram do laboratório um espaço de trabalho tremendamente agradável.

Aos meus colegas de curso e agora colegas de trabalho Cristina Costa, Ricardo Tavares, e em especial à Alice Pereira e ao Pedro Tavares pela ajuda no laboratório e em problemas com os computadores.

À Dra. Maria do Rosário, pela boa vontade e ajuda com os inúmeros problemas e "manias" do espectrómetro de RMN.

Ao Professor Jorge Lampreia (FCT/UNL) pela ajuda com os problemas dos computadores.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT), agradeço o facto de ter-me concedido a Bolsa de Doutoramento e o respectivo apoio financeiro que permitiu que fosse possível a realização desta tese. À Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento (FLAD) e à Fundação Calouste Gulbenkian os apoios financeiros para as minhas deslocações ao estrangeiro, para estágios e participações em congressos.

Um agradecimento muito especial à Lena, pela paciência, ajuda, incentivo, compreensão e amizade inesgotável.

Aos meus amigos Rita, Maria, Hermann, Nelson, João e Pedro quero agradecer os bons momentos, o apoio, a amizade e a disponibilidade para me ajudarem nos meus problemas.

Gostaria por fim de agradecer aos meus pais de uma forma muito especial, dedicando-lhes esta tese. Agradeço-lhes muito do fundo do coração serem uns pais extraordinários que sempre me apoiaram ao longo de toda a minha vida em todas as circunstâncias.



## RESUMO

As ferredoxinas são proteínas de baixo peso molecular que contêm agregados [Fe-S] do tipo [3Fe-4S], [4Fe-4S], [3Fe-4S] + [4Fe-4S] e 2 x [4Fe-4S], podendo ser utilizadas como compostos modelo na investigação das propriedades electrónicas, paramagnéticas e estruturais de agregados [Fe-S] em enzimas complexas.

A ferredoxina II (FdII) isolada da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio gigas* (Dg) é uma proteína tetramérica de transferência electrónica com 58 resíduos de amino ácidos (seis cisteínas), que contém um centro [3Fe-4S] coordenado por três ligandos cisteicos; Cys 8, Cys 14 e Cys 50, e uma ponte dissulfureto entre os resíduos Cys 18 e Cys 42. A caracterização tanto bioquímica como espectroscópica recorrendo nomeadamente à espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de 1D e 2D, em conjugação com outras técnicas espectroscópicas, tais como a Ressonância Paramagnética Electrónica, UV/Vísivel e Mössbauer foi já realizada para o estado oxidado desta proteína, de forma a compreender as suas propriedades redox e electrónicas.

Durante o estudo do comportamento redox desta proteína foi descoberto um intermediário,  $DgFdII_{int}$ , originado pelo abertura da ponte dissulfureto. Devido à sua estabilidade, e utilizando as mesmas técnicas já utilizadas anteriormente para o estado oxidado, foi possível obter a sua caracterização. São assim apresentadas as atribuições específicas das ressonâncias pertencentes aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> dos resíduos cisteicos coordenantes e a análise da dependência angular das mesmas, possibilitando juntamente com as coordenadas de raios-X para o estado oxidado, uma comparação dos ângulos diedros entre os estados oxidado e intermediário da  $DgFdII$ . Foi também introduzido um novo modelo de

acoplamento de spins para o estado intermediário de modo a obter valores para as constantes de acoplamento,  $J$  dos átomos de ferro do agregado metálico.

A existência de um quarto sítio desocupado no agregado [3Fe-4S] (Cys 11), abre a possibilidade da inserção de um quarto átomo metálico. Foi assim sintetizado o agregado misto [Co, 3Fe-4S] para o qual foi realizada uma breve análise espectroscópica, permitindo pela primeira vez a obtenção de um espectro de RMN de 1D e a análise das ressonâncias situadas no envelope paramagnético do mesmo, para os estados oxidado e reduzido do centro heterometálico.

Tendo em conta a dificuldade de obtenção da *DgFdII* em termos de tempo e de quantidade, foi feita a clonagem e sobre-expressão desta proteína em *E.coli*, utilizando o vector de expressão pT7-7. Foi posteriormente realizada uma breve caracterização espectroscópica da proteína sobre expressa; *DgFdII<sub>rec</sub>*.

Finalmente, foi isolada de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, uma nova ferredoxina do tipo 2 x [4Fe-4S]. Esta proteína foi posteriormente caracterizada bioquimicamente e por espectroscopia de RMN de 1D e 2D, utilizando a mesma metodologia e informação obtida para a *DgFdII<sub>int</sub>*.

## ABSTRACT

Ferredoxins are low molecular weight iron-sulfur proteins containing clusters type like [3Fe-4S], [4Fe-4S], [3Fe-4S] + [4Fe-4S] and 2 x [4Fe-4S], that can be used as model compounds in the investigation of electronic, paramagnetic and structural properties of the [Fe-S] clusters in more complex enzymes.

Ferredoxin II (FdII) isolated from the sulfate reducer bacteria *Desulfovibrio gigas* (Dg) is a tetrameric electron transfer protein, with 58 amino acids residues (six cysteines), containing one [3Fe-4S] cluster coordinated by three cysteinyl ligands; Cys 8, Cys 14 and Cys 50, and one disulfide bridge between residues Cys 18 and Cys 42. The biochemical characterization, as well as the spectroscopic one, using 1D and 2D Nuclear Magnetic Resonance (NMR) in conjunction with other spectroscopic techniques, like Electronic Paramagnetic Resonance, UV/Visible and Mössbauer, have already been done for the oxidized state of the protein, in order to understand his redox and electronic properties.

During the study of the redox behaviour of this protein, an intermediate state ,  $DgFdII_{int}$ , was discovered, originated by the opening of the disulfide bridge. Due to the stability of this intermediate state, and using the same techniques already used for the oxidized state, it was possible to characterize it. The specific assignments of the resonances of the  $\beta$ -CH<sub>2</sub> protons of the cysteinyl coordinating residues, as well as their angular dependence, are presented, allowing together with the X-ray coordinates for the oxidized state, a comparison of the dihedral angles between the oxidized and intermediated states of  $DgFdII$ . It was also introduced a new spin coupling model for the intermediate state in order to obtain values for the coupling constants,  $J$ , of the iron atoms belonging to the metal center.

The unoccupied fourth site in the [3Fe-4S] (Cys 11) cluster is ready to be hosted, enabling the synthesis of heterometal cores of the type [M, 3Fe-4S]. The mixed cluster [Co, 3Fe-4S] was then synthesized. A brief spectroscopic characterization was then made, allowing for the first time the obtention of an 1D NMR spectrum and the analysis of the resonances situated in the paramagnetic envelope of this one, for the oxidized and reduced states of this heterometallic cluster.

Taking in account how difficult it is to obtain *DgFdII* in terms of time and amount, the protein was cloned and overexpressed in *E.coli*, using the expression vector pT7-7. The overexpressed protein *DgFdII<sub>rec</sub>* was then spectroscopically characterized.

Finally, it was isolated from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 a novel new ferredoxin containing 2 x [4Fe-4S] clusters. This protein was then characterized biochemically and by 1D and 2D NMR spectroscopy, using the same methodology and information obtained for *DgFdII<sub>int</sub>*.

## ABREVIATURAS

A	Constante de acoplamento de spin nuclear entre o átomo de ferro e os prótons $\beta$ -CH <sub>2</sub> da cisteína coordenante
<i>Aa</i>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>
Abs	Absorvância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>Av</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
B	Campo magnético / Constante de acoplamento
<i>Cau</i>	<i>Clostridium acidi urici</i>
COSY	Espectroscopia correlacionada a duas dimensões
<i>Cp</i>	<i>Clostridium pasteurianum</i>
$\delta$	Desvio isomérico/desvio químico
$\delta_c$	Desvio de contacto
$\delta_{pc}$	Desvio de pseudo contacto
<i>Da</i>	<i>Desulfovibrio africanus</i>
<i>Dd</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
<i>DdN</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans Norway</i>
<i>Dd27Fd<sub>nat</sub></i>	Estado nativo da Fd de <i>Dd</i> ATCC 27774
<i>Dd27Fd<sub>red</sub></i>	Estado reduzido da Fd de <i>Dd</i> ATCC 27774
<i>Dd27Fd<sub>ox</sub></i>	Estado oxidado da Fd de <i>Dd</i> ATCC 27774
DDS	Deslocalização dependente de spins
DEAE	Dietil-amino-etil-celulose
<i>Dg</i>	<i>Desulfovibrio gigas</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPV	Voltametria Diferencial por Impulsos
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
ENDOR	<i>Electron Nuclear Double Resonance</i>
EXAFS	Estrutura Fina por Absorção Extensa de Raios-X
$\epsilon$	Coeficiente de extinção molar

Fd	Ferredoxina
FdII <sub>int</sub>	Estado intermediário da FdII de <i>D.gigas</i>
FdII <sub>ox</sub>	Estado oxidado da FdII de <i>D.gigas</i>
FdII <sub>red</sub>	Estado reduzido da FdII de <i>D.gigas</i>
FdIIrec	FdII de <i>D.gigas</i> sobre expressa
[Fe-S]	Agregados de ferro e enxofre
FID	Decaimento livre da indução
HDv V	Hamiltoniano de Heisenberg-Dirac-van Vleck
HiPIP	Proteína de ferro e enxofre de alto potencial
HYSCORE	<i>Hyperfine Sublevel Correlation</i>
I	Spin nuclear
IPTG	isopropilo-β-tio-D-galactosídio
J	Constante de acoplamento de transferência ou permuta entre dois átomos de ferro
MCD	Dicroísmo Circular Magnético
M-COSY	Magnitude COSY
<i>Ms</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
NOE	Efeito nuclear de Overhauser
NOESY	Espectroscopia a duas dimensões do NOE
PCR	Reacção em cadeia da polimerase
<i>Pn</i>	<i>Pseudomonas nautica</i>
<i>Pp</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
Primer	Polinucleótido ao qual se liga a polimerase do DNA durante a sua replicação
<i>Ps</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Rc</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Raiz quadrada da média do quadrado dos desvios
RNA	Ácido ribonucleico
RPE	Ressonância Paramagnética Electrónica
RR	Ressonância de Raman
S	Spin electrónico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
<i>Se</i>	<i>Saccharopolyspora erythrea</i>

<i>Sg</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
T	Temperatura
Ta	Temperatura ambiente
T <sub>1</sub>	Tempo de relaxação longitudinal
T <sub>2</sub>	Tempo de relaxação transversal
TOCSY	Espectroscopia de relaxação total a duas dimensões
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
Tris	Tris (hidroximetil) aminoetano
<i>Tt</i>	<i>Thermus aquaticus subsp.thermophilus</i>
WEFT	Sequência de pulsos para eliminação do pico da água
U.V.	Radiação ultra-violeta
ZFS	Desdobramento a campo zero

### **Amino ácidos ou resíduos de amino ácidos**

A ou Ala	Alanina
C ou Cys	Cisteína
D ou Asp	Ácido aspártico
E ou Glu	Ácido glutâmico
F ou Phe	fenilalanina
G ou Gly	Glicina
H ou His	Histidina
I ou Ile	Isoleucina
K ou Lys	Lisina
L ou Leu	Leucina
M ou Met	Metionina
N ou Asn	Asparagina
P ou Pro	Prolina
Q ou Gln	Glutamina
R ou Arg	Arginina
S ou Ser	Serina
T ou Thr	Treonina
V ou Val	Valina
W ou Trp	Triptofano
Y ou Tyr	Tirosina



## ÍNDICE GERAL

### CAPÍTULO I. As Ferredoxinas. Proteínas simples contendo centros [Fe-S]

I. Introdução	4
I.1. Centros [2Fe-2S]	6
I.2. Centros [3Fe-4S]	7
I.3. Centros [4Fe-4S]	10
I.4. Centros [3Fe-4S] + [4Fe-4S]	11
I.5. Centros 2 x [4Fe-4S]	15
I.6. Dinâmica estrutural entre centros [3Fe-4S] e [4Fe-4S]	17
I.7. Centros heterometálicos [M, 3Fe-4S]	18
I.8. Propriedades electrónicas dos centros [Fe-S]	20
I.9. Aspectos recentes dos centros [Fe-S]	26
I.9.1. Novos agregados	27
I.9.2. Funções biológicas	34
I.9.2.1. Funções catalíticas	34
I.9.2.2. Funções sensoriais	36
I.9.2.3. Manutenção de subunidades	38
I.9.2.4. Outras funções	38
I.10. A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) aplicada aos centros [Fe-S]	39
I.10.1. Noções teóricas	41
I.10.1.1. O desvio hiperfino isotrópico	41
I.10.1.2. A relaxação de spin	46
I.10.1.3. O Efeito Nuclear de Overhauser (NOE)	48
I.10. Bibliografia	51

### CAPÍTULO II. O estado nativo da ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas*

II.1. Breve caracterização	63
II.2. Ressonância Magnética Nuclear. Atribuição específica das ressonâncias dos	

protões do agregado $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$	65
II.3. A estrutura em solução da $DgFdII_{ox}$	67
II.4. O acoplamento entre os átomos de ferro no centro $[3\text{Fe-4S}]$	71
II.4.1. Noções teóricas	71
II.4.2. O valor de J	75
II.5. Bibliografia	77

### **CAPÍTULO III. A caracterização do estado redox intermediário da ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas***

III.1. Objectivo	81
III.2. O estado intermediário da ferredoxina II de <i>D.gigas</i> ( $DgFdII_{int}$ )	81
III.3. Materiais e métodos	82
III.3.1. Purificação da $DgFdII_{nat}$	84
III.3.2. A formação do estado intermediário	84
III.4. Resultados – Caracterização da $DgFdII_{int}$	85
III.4.1. RMN de protão de 1D e dependências de temperatura	85
III.4.2. Experiências de NOE em RMN de protão de 1D e 2D	88
III.4.3. Atribuição específica das ressonâncias dos protões do agregado $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$ do estado intermediário	92
III.4.4. Dependência angular das ressonâncias paramagnéticas	94
III.5. Conclusões	98
III.6. Bibliografia	102

### **CAPÍTULO IV. O modelo de acoplamento de spins para o estado intermediário da $DgFdII$**

IV.1. Objectivo	107
IV.2. Considerações teóricas	107
IV.3. O modelo aplicado aos estados intermediário e oxidado da $DgFdII$ ; os valores de J e de A	110
IV.4. Estudo qualitativo do modelo de acoplamento de spins para a $DgFdII_{int}$ .	116

IV.5. Conclusões	123
IV.6. Bibliografia	125

## **CAPÍTULO V. O centro heterometálico [Co, 3Fe-4S]**

V.1. Objectivo	129
V.2. Introdução	129
V.3. Materiais e métodos	131
V.4. Caracterização espectroscópica do centro [Co, 3Fe-4S]	132
V.4.1. Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)	132
V.4.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	134
V.5. Conclusões	139
V.6. Bibliografia	141

## **CAPÍTULO VI. Caracterização de uma ferredoxina isolada de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774**

VI.1. Objectivo	145
VI.2. Materiais e métodos	145
VII.2.1. Purificação da ferredoxina de <i>D.desulfuricans</i> ( <i>Dd</i> ) ATCC 27774 - – <i>Dd27Fd</i>	147
VI.3. Resultados – Caracterização da <i>Dd27Fd</i>	148
VI.3.1. Espectroscopia de UV/Visível	148
VI.3.2. Determinação e análise da sequência NH <sub>2</sub> – terminal	150
VI.3.3. Determinação da absorvidade molar e do número de ferros	151
VI.3.4. Estrutura terciária	151
VI.3.5. Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)	151
VI.3.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	153
VI.3.6.1. RMN de protões de 1D e 2D	153
VI.3.6.2. Atribuição específica das ressonâncias aos ligandos dos protões dos agregados [4Fe-4S]	160
VI.3.7. Dependência angular das ressonâncias paramagnéticas	163

VI.4. Conclusões	165
VI.5. Bibliografia	168

## **CAPÍTULO VII. Clonagem e sobre-expressão da ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas*.**

VII.1. Introdução	173
VII.2. Materiais e métodos	173
VII.2.1. Clonagem do gene da ferredoxina II de <i>Desulfovibrio gigas</i> (Dg)	175
VII.2.2. Expressão da ferredoxina recombinante (DgFdII <sub>rec</sub> )	176
VII.2.3. Purificação da DgFdII <sub>rec</sub>	177
VII.3. Resultados - Caracterização da DgFdII <sub>rec</sub>	178
VII.3.1. Clonagem, Expressão e Purificação	178
VII.3.2. Electroforese em gel de poliacrilamida – Pureza da proteína	178
VII.3.3. Espectro de UV/Visível – Quantificação e pureza da proteína	180
VII.3.4. Estrutura terciária	182
VII.3.5. Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)	182
VII.3.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	183
VII.4. Conclusões	185
VII.5. Bibliografia	189

<b>APÊNDICE A. A Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)</b>	191
--	-----

<b>APÊNDICE B. O Programa para o Modelo de Acoplamento de Spins para o Estado Intermediário da Ferredoxina II de <i>Desulfovibrio gigas</i></b>	203
---	-----

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura I.1.** Estruturas básicas dos agregados [Fe-S] em ferredoxinas. 5
- Figura I.2.** Motivos de coordenação dos centros [3Fe-4S] e [4Fe-4S] à cadeia polipeptídica dos diferentes tipos de ferredoxinas. 9
- Figura I.3.** Sequência N-terminal de algumas ferredoxinas de 7Fe: *Av*=*A.vinelandii*, *Pp*=*Ps.putida*, *Ps*=*Ps.stutzeri*, *Rc*=*Rhodobacter capsulatus*, *Ms*=*Mycobacterium smegmatis*, *Sg*=*Streptomyces griseus*, *Aa*=*Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Tt*=*Thermus aquaticus subsp.thermophilus*, *Se*=*Saccharopolyspora erythraea*. 12
- Figura I.4.** Modelo redox representativo de uma ferredoxina  $2x[4Fe-4S]^{2/+}$ , tal como observado para as ferredoxinas de *Cp* e de *Cau*. As setas a cheio representam um equilíbrio lento, enquanto as setas a tracejado representam um equilíbrio rápido. 16
- Figura I.5.** Esquema representativo da conversão entre os centros [3Fe-4S] e [4Fe-4S]. 17
- Figura I.6.** Deslocalização dependente do spin (DDS) para um dímero simétrico  $Fe^{+2}Fe^{+3}$ , descrevendo ambos os alinhamentos de spin ferromagnético e antiferromagnético. O acoplamento de spin de  $Fe^{+2}$  ( $S_a=2$ ) e  $Fe^{+3}$  ( $S_b=5/2$ ) pelo HDV V gera estados de spin do sistema S, com energias  $JS(S+1)/2$ . À direita são mostrados os estados de spin mais baixo ( $S=1/2$ ) e mais alto ( $S=9/2$ ) resultantes para valores de  $J>0$ . O sexto electrão pode estar localizado num dos sítios a ou b, pelo que cada multiplete de spin ocorre duas vezes. A deslocalização por ressonância deste sexto electrão (curva oval), mistura as configurações degeneradas  $Fe^{+2}Fe^{+3}$  e  $Fe^{+3}Fe^{+2}$ , provocando uma separação adicional  $\pm B(S+1/2)$ . A deslocalização é favorecida para o alinhamento de spins paralelo do estado  $S=9/2$  (topo), mas impedida para o estado  $S=1/2$ . ( Tal como desenhado para a configuração antiferromagnética, os cinco spins remanescentes no sítio a, não representam um puro estado de spin  $S_a=5/2$  de um ião  $Fe^{+3}$ . A interacção por ressonância mistura somente configurações com o mesmo spin total. Estados com spin local  $S_a<5/2$  não são favoráveis, levando a uma redução da separação das ressonâncias para o estado  $S=1/2$  ). O diagrama da direita mostra que a DDS pode reverter a ordem dos estados de spin obtidos a partir da troca antiferromagnética. 22
- Figura I.7.** Estruturas, estados de spin (S) e esquemas de valência deslocalizada para os estados de oxidação conhecidos dos agregados [2Fe-2S],

[3Fe-4S] e [4Fe-4S]. S <sup>-2</sup> - cor cinzenta, Fe <sup>+3</sup> - cor preta, Fe <sup>+2</sup> - cor branca, Fe <sup>+2.5</sup> - cor branca com círculo ao centro preto.	24
<b>Figura I.8.</b> Estrutura do agregado híbrido da proteína de ferro-enxofre de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> . As distâncias entre as ligações são dadas em angstroms.	28
<b>Figura I.9.</b> Representação do sítio activo da hidrogenase [NiFe] de <i>Desulfovibrio gigas</i> . O ião Ni encontra-se coordenado por quatro resíduos cisteicos, dos quais dois servem de ligandos ponte entre o Ni e ião Fe. Os ligandos L1, L2 e L3, são ligandos não proteicos, correspondendo respectivamente a CO e CN, CN. A figura foi feita utilizando o programa MOLSCRIPT.	29
<b>Figura I.10.</b> Representação esquemática dos cinco agregados [Fe-S] da hidrogenase de [Fe] de <i>Clostridium pasteurianum</i> , com especial relevância para o sítio activo ou agregado H, do qual é apresentada uma perspectiva estéreo.	31
<b>Figura I.11.</b> Comparação dos sítios activos das hidrogenases de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (à esquerda) e <i>Desulfovibrio gigas</i> (à direita).	32
<b>Figura I.12.</b> Esquema representativo das mudanças estruturais que acompanham o processo oxidativo do agregado P da nitrogenase.	33
<b>Figura I.13.</b> Descrição esquemática da interconversão de agregados representativos da forma inactiva e activa da aconitase.	34
<b>Figura I.14.</b> Diferentes tipos de química baseada no átomo de S propostas para os agregados [4Fe-4S], com os respectivos estados de oxidação formal apresentados dentro de caixas rectangulares.	35
<b>Figura I.15.</b> Esquema representativo da função ferro-sensorial da IRP-1. IRE – "Iron Responsive Element" IRE-BP – "Iron Responsive Element – Binding Protein".	37
<b>Figura I.16.</b> Possíveis experiências de RMN de protão de 1D e 2D a realizar numa proteína paramagnética de forma a obter correlações entre os vários tipos de sinais do espectro de RMN de 1D da mesma.	41
<b>Figura I.17.</b> Relação entre o vector M-H, a estrutura de referência da proteína, e os eixos dos três cosenos directores que definem o tensor de susceptibilidade magnética, $\chi$ .	43
<b>Figura II.1.</b> Características estruturais da DgFdII, baseadas nas coordenadas de raios-X gentilmente cedida pelo Dr. Nuno Palma (em cima), e respectiva sequência de amino ácidos (em baixo).	63
<b>Figura II.2.</b> Modelo redox para a DgFdII.	64
<b>Figura II.3.</b> Espectro completo de RMN de protão a 600MHz da FdII de <i>D.gigas</i> no estado oxidado (nativo). A amostra encontra-se	

- dissolvida em  $^2\text{H}_2\text{O}$  (100mM tampão fosfatos pH 8.0) a uma concentração de 2mM, sendo o espectro adquirido à temperatura de 300K com supressão do pico da água. As ressonâncias a campo baixo (zona paramagnética do espectro) foram marcadas de **a-d**. 65
- Figura II.4.** Esquema representativo da metodologia utilizada na determinação da estrutura de uma proteína em solução pela técnica de RMN. 69
- Figura II.5.** **A** – Representação em estéreo das 15 estruturas da  $DgFdII_{ox}$  obtidas por RMN de próton. Estas estruturas representam uma família com uma energia mínima cujo r.m.s.d. é de 0.77Å. **B** – Representação em salsicha da família, incluindo o agregado (preto). A espessura e cor são representativas dos valores de r.m.s.d. para cada resíduo relativamente a um valor médio global da estrutura (obtido no MOLMOL). A cor vermelha é indicativa de resíduos com um valor médio de r.m.s.d. >1.00Å, laranja >0.50Å e amarelo para valores <0.50Å. **C** - Sobreposição dos esqueletos representativos da estrutura da  $DgFdII_{ox}$  obtida em solução (preto) e por cristalografia de raios-X (vermelho). 70
- Figura II.6.** Representação esquemática do acoplamento entre os ferros no agregado 3Fe da  $DgFdII_{ox}$ . 73
- Figura III.1.** Espectro completo de RMN de próton a 400MHz (com supressão do pico da água) de uma mistura de  $DgFdII_{ox}/DgFdII_{int}$  em  $^2\text{H}_2\text{O}$  a 310K. A região a campo baixo expandida apresenta ressonâncias, marcadas de **a-d** e **A-D**, pertencentes aos estados oxidado e intermediário da  $DgFdII$ , respectivamente. A mistura é composta por 54% de estado oxidado e 46% de estado intermediário. Não foi detectado estado reduzido. 86
- Figura III.2.** Dependência com a temperatura dos sinais a campo baixo, obtidos por RMN de próton, para a  $DgFdII_{ox}$  (**A**) e  $DgFdII_{int}$  (**B**) para os resíduos cisteicos 8, 14 e 50. As linhas a cheio indicam a tendência de comportamento da dependência de temperatura na gama de temperaturas representada. \* A atribuição específica destas ressonâncias é posteriormente realizada na secção II.4.3. 87
- Figura III.3.** Região a campo baixo dos espectros NOESY 2D de RMN (1- tempo de mistura de 8 ms e 2- tempo de mistura de 10 ms ) de próton de uma mistura de  $DgFdII_{ox}/DgFdII_{int}$  em  $^2\text{H}_2\text{O}$  a 303 K. O quociente  $FdII_{ox}/FdII_{int}$  é de 42/58. As linhas a cheio representam as correlações entre as diferentes ressonâncias. As ressonâncias no espectro de RMN de 1D de prótons marcadas de **a-d** pertencem ao estado oxidado e as de **A-D** ao estado intermediário. 99
- Figura III.4.** Espectros de NOE 1D de RMN de próton, a 600 MHz e 310 K, da  $DgFdII$  no estado intermediário, obtidos por irradiação dos picos **B**, **C** e **D**. 90
- Figura III.5.** Região do espectro de NOESY 2D de RMN de próton a 600 MHz e 300 K, com um tempo de mistura de 150 ms da  $DgFdII_{ox}$  (**A**),

$DgFdII_{int} + DgFdII_{ox}$  (B) e  $DgFdII_{red}$  (C). A seta em (A), indica o pico cruzado que correlaciona o próton  $H\alpha$  da cisteína 18 com o próton  $H\beta$  da cisteína 42. Em (B) este pico cruzado é menos intenso do que em (A), e desaparece completamente em (C) quando a proteína é reduzida.

92

**Figura III.6.** Melhor ajuste para a versão modificada da equação de Karplus  $\delta = a \sin^2(\theta) + b \cos(\theta) + c$ , para a curva dos desvios de contacto dos prótons  $\beta-CH_2$  dos resíduos cisteicos *versus* os ângulos diedros,  $\theta$ , para sistemas de  $[3Fe-4S]$ . Os valores obtidos para as constantes são  $a = 43.5$ ,  $b = -0.66$  e  $c = 3.04$ . Os valores utilizados para a precisão, desvio standard ao desvio químico e desvio standard ao ângulo diedro foram 0.01, 5 e 10 respectivamente. Os desvios químicos experimentais utilizados foram os de  $DgFdII$ , e  $AvFd$  (7Fe). Os valores de  $\theta$  foram obtidos a partir das estruturas de raios-X das ferredoxinas de  $Dg$  [12] e  $Av$ .  $DgFdII$  (● - Cys 50, ▲ - Cys 14, ■ - Cys 8).  $AvFd$  (○ - Cys 49, △ - Cys 16).

96

**Figura III.7.** Determinação dos ângulos diedros (Fe-S $\gamma$ -C $\beta$ -C $\alpha$ ) para os ligandos cisteicos do agregado  $[3Fe-4S]$  da  $DgFdII_{int}$ . A figura representa uma projecção da relação entre os desvios químicos dos prótons  $\beta-CH_a$  (eixo dos X) e  $\beta-CH_b$  (eixo dos Y). A curva representada com os respectivos valores de  $\theta$ , é gerada a partir da equação modificada de Karplus (equação III.1).  $DgFdII_{ox}$  (● - Cys 50, ▲ - Cys 14, ■ - Cys 8)  $DgFdII_{int}$  (○ - Cys 50, △ - Cys 14, □ - Cys 8).

97

**Figura IV.1.** Dependência com a temperatura do desvio químico médio das ressonâncias dos três pares de prótons  $\beta-CH_2$  pertencentes aos três ligandos (Cys 8, 14 e 50) que coordenam o agregado de 3Fe, para os estados oxidado ( $DgFdII_{ox}$ ) e intermediário ( $DgFdII_{int}$ ).

108

**Figura IV.2.** Curvas teóricas obtidas a partir do modelo da dependência com a temperatura do desvio químico das ressonâncias de contacto calculadas para os prótons  $\beta-CH_2$  coordenados ao centro  $[3Fe-4S]$  da  $DgFdII_{int}$ . A,B e C, representam os três casos referidos na tabela V.1. A cinza, encontra-se delimitada a gama de temperaturas da RMN, a qual pode ser observada com pormenor à direita em que se sobrepõem os valores experimentais obtidos na gama de temperaturas da RMN (com os símbolos ○, △, □) com as curvas teóricas.

112

**Figura IV.3.** Curvas teóricas obtidas a partir do modelo da dependência com a temperatura do desvio químico das ressonâncias de contacto calculadas para os prótons  $\beta-CH_2$  coordenados ao centro  $[3Fe-4S]$  da  $DgFdII_{ox}$ . A,B e C, representam os três casos referidos na tabela IV.2. A cinza, encontra-se delimitada a gama de temperaturas da RMN, a qual pode ser observada com pormenor à direita em que se sobrepõem os valores experimentais obtido na



- gama de temperaturas do RMN (com os símbolos ●, ▲, ■) com as curvas teóricas. 115
- Figura IV.4.** Variação do valor do desvio químico e declive da recta que o relaciona, com o inverso da temperatura para cada um dos pares de prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas 8,14 e 50, com o valor das constantes de acoplamento  $J_{12}$ ,  $J_{13}$  e  $J_{23}$ , para o modelo de acoplamento de spins gerado para a  $DgFdII_{int}$ . Para todos os quatro casos,  $\Delta J=28$ ,  $\Delta J'=21$ ,  $\Delta J''=7$ ,  $A_1=3.34$ ,  $A_2=0.295$  e  $A_3=1.91$ . A ( $J_{12}=446$ ,  $J_{13}=467$  e  $J_{23}=439$ ), B ( $J_{12}=346$ ,  $J_{13}=367$  e  $J_{23}=339$ ), C ( $J_{12}=246$ ,  $J_{13}=267$  e  $J_{23}=239$ ) e D ( $J_{12}=146$ ,  $J_{13}=167$  e  $J_{23}=139$ ). 117
- Figura IV.5.** Variação dos valor do desvio químico e declive da recta que o relaciona, com o inverso da temperatura para cada um dos pares de prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas 8,14 e 50, com o valor de  $\Delta J$  e  $\Delta J'$ , para o modelo de acoplamento de spins gerado para a  $DgFdII_{int}$ . Para todos os cinco casos,  $\Delta J''=7$ ,  $A_1=3.34$ ,  $A_2=0.295$  e  $A_3=1.91$ . A ( $\Delta J=12$ ,  $\Delta J'=5$ ), B ( $\Delta J=17$ ,  $\Delta J'=10$ ), C ( $\Delta J=32$ ,  $\Delta J'=25$ ), D ( $\Delta J=42$ ,  $\Delta J'=35$ ) e E ( $\Delta J=52$ ,  $\Delta J'=45$ ). 118
- Figura IV.6.** Variação do valor do desvio químico e declive da recta que o relaciona, com o inverso da temperatura para cada um dos pares de prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas 8,14 e 50, com o valor de  $\Delta J$  e  $\Delta J''$ , para o modelo de acoplamento de spins gerado para a  $DgFdII_{int}$ . Para todos os cinco casos,  $\Delta J'=21$ ,  $A_1=3.34$ ,  $A_2=0.295$  e  $A_3=1.91$ . A ( $\Delta J=28$ ,  $\Delta J''=7$ ), B ( $\Delta J=37$ ,  $\Delta J'=16$ ), C ( $\Delta J=47$ ,  $\Delta J'=26$ ), D ( $\Delta J=57$ ,  $\Delta J'=36$ ) e E ( $\Delta J=67$ ,  $\Delta J'=46$ ). 120
- Figura IV.7.** Variação do valor do desvio químico e declive da recta que o relaciona com o inverso da temperatura para cada um dos pares de prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas 8,14 e 50, com o valor de  $\Delta J'$  e  $\Delta J''$ , para o modelo de acoplamento de spins gerado para a  $DgFdII_{int}$ . Para todos os cinco casos,  $\Delta J=28$ ,  $A_1=3.34$ ,  $A_2=0.295$  e  $A_3=1.91$ . A ( $\Delta J'=28$ ,  $\Delta J''=0$ ), B ( $\Delta J'=22$ ,  $\Delta J''=6$ ), C ( $\Delta J'=17$ ,  $\Delta J''=11$ ), D ( $\Delta J'=12$ ,  $\Delta J''=16$ ) e E ( $\Delta J'=0$ ,  $\Delta J''=28$ ). 121
- Figura IV.8.** Variação do valor do desvio químico e declive da recta que o relaciona com o inverso da temperatura para cada um dos pares de prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas 8,14 e 50, com o valor de A, para o modelo de acoplamento de spins gerado para a  $DgFdII_{int}$ . Em todos os três casos  $J_{12}=446$ ,  $J_{13}=467$  e  $J_{23}=439$ . Os dois valores de A, não referenciados em cada um dos casos mantêm-se constantes e iguais a  $A_1=3.34$ ,  $A_2=0.295$  e  $A_3=1.91$ . 122

- Figura V.1.** Espectro de EPR do centro [Co,3Fe-4S] no estado oxidado. A – T=12K B – T=40K. Os espectros foram adquiridos com uma amplitude de modulação de 0.5mT e potência de 2mW. 133
- Figura V.2.** Espectro completo de RMN de próton (com supressão do pico da água) no estado oxidado, a 400MHz e 300K, da DgFdII contendo o agregado [Co,3Fe-4S]<sup>+2</sup>. As ressonâncias pertencentes aos prótons próximos do centro paramagnético situadas nas regiões a campo baixo e campo alto, encontram-se marcadas. As ressonâncias A,B,C,D e E pertencem ao agregado [Co,3Fe-4S]<sup>+2</sup>, e as ressonâncias assinaladas com Δ pertencem à espécie DgFdII<sub>ox</sub>. 135
- Figura V.3.** Espectro completo de RMN de próton (com supressão do pico da água), a 400MHz e 300K, por adição de ditionito de sódio à DgFdII contendo o agregado [Co,3Fe-4S]<sup>+1</sup>. As ressonâncias pertencentes aos prótons próximos do centro paramagnético situadas nas regiões a campo baixo e campo alto, encontram-se marcadas. As ressonâncias a,b,c,d e e pertencem ao agregado [Co, 3Fe-4S]<sup>+1</sup>, enquanto que as ressonâncias assinaladas com • pertencem ao agregado [Co, 3Fe-4S]<sup>+2</sup> e as ressonâncias assinaladas com Δ pertencem à espécie DgFdII<sub>red</sub>. 135
- Figura V.4.** Dependência com a temperatura dos sinais a campo baixo (A) e campo alto (B), obtidos por RMN de próton (Figura V.2.), para o estado oxidado da DgFdII contendo o centro [Co,3Fe-4S]<sup>+2</sup>. As ressonâncias A,B,C,D e E pertencem ao agregado [Co,3Fe-4S]<sup>+2</sup>, e as ressonâncias assinaladas com Δ pertencem à espécie DgFdII<sub>ox</sub>. 137
- Figura V.5.** Dependência com a temperatura dos sinais a campo baixo (A) e campo alto (B), obtidos por RMN de próton (Figura V.3.), por adição de ditionito de sódio à DgFdII contendo o centro [Co,3Fe-4S]<sup>+1</sup>. As ressonâncias a,b,c,d e e pertencem ao agregado [Co, 3Fe-4S]<sup>+1</sup>, enquanto que as ressonâncias assinaladas com • pertencem ao agregado [Co, 3Fe-4S]<sup>+2</sup> e as ressonâncias assinaladas com Δ pertencem à espécie DgFdII<sub>red</sub>. 138
- Figura VI.1.** Esquema geral de purificação da Dd27Fd<sub>nat</sub>. Os tampões indicados referem-se aos tampões de eluição da proteína das respectivas colunas. Entre parêntesis encontra-se indicada a força iônica a que a proteína foi eluída. GC-gradiente contínuo GD-Gradiente descontínuo. 147
- Figura VI.2.** Espectro de UV/Visível da Dd27Fd<sub>nat</sub>. A proteína encontra-se dissolvida em tampão fosfatos 50mM, pH 7.6 + 150mM NaCl. Abs<sub>390nm</sub>/Abs<sub>275nm</sub> = 0.59. 148
- Figura VI.3.** Estudo da influência do oxigénio no espectro de UV/Visível da Dd27Fd, por exposição da proteína ao ar. A proteína encontra-se dissolvida em tampão fosfatos 50mM, pH 7.6 + 150mM NaCl, e a

- uma temperatura de 4°C. Os espectros são obtidos com diferenças de 20 min entre si. 149
- Figura VI.4.** Comparação da sequência de amino ácidos da ferredoxina de *Dd* ATCC 27774 (*Dd27Fd*) com outras ferredoxinas de 7Fe e 8Fe. (8Fe)*Cau* – *Clostridium acidi urici*, (8Fe)*Cv* – *Chromatium vinosum*, (8Fe)*Pa* – *Peptococcus aerogenes*, (8Fe)*Cp* – *Clostridium pasteurianum*, (8Fe)*DdN* – *Desulfovibrio desulfuricans* Norway, (7Fe)*Pa* – *Pseudomonas nautica*, (7Fe)*Da* – *Desulfovibrio africanus*. 150
- Figura VI.5.** Espectro de RPE da *Dd27Fd*. A- Estado nativo B- Estado reduzido por adição de ditionito de sódio. Os espectros foram adquiridos a uma temperatura de 12.5K; ganho de  $20 \times 10^3$ ; amplitude de modulação de 4.05Gpp; frequência de 9.65GHz e potência de 2.007mW. 152
- Figura VI.6.** Espectros de RMN de próton a 400MHz da *Dd27Fd* (com supressão do pico da água). A- Espectro completo do estado nativo (*Dd27Fd<sub>nat</sub>*) B- Região a campo baixo da *Dd27Fd<sub>nat</sub>* C- Estado reduzido (*Dd27Fd<sub>red</sub>*) e D- Estado oxidado (*Dd27Fd<sub>ox</sub>*). 153
- Figura VI.7.** Espectro de RMN de próton a 400MHz da região a campo baixo da *Dd27Fd<sub>nat</sub>* com as ressonâncias marcadas de a a m (com supressão do pico da água), e estudo do comportamento das mesmas com a temperatura. 154
- Figura VI.8.** Espectros de RMN de próton a 300MHz da FdI de *D.gigas* purificada aerobiamente. A – Proteína nativa (estado oxidado). B – estado reduzido com ditionito (já visível o sinal da proteína reoxidada). C-E – ciclo de reoxidação com ar. ( Figura gentilmente cedida por Macedo e colaboradores ). 156
- Figura VI.9.** Espectro de RMN de próton a 400MHz da região a campo baixo da *Dd27Fd<sub>red</sub>* com as ressonâncias marcadas de A' a Z<sub>1</sub>' (com supressão do pico da água), e estudo do comportamento das mesmas com a temperatura. 157
- Figura VI.10.** Espectro de RMN de próton a 400MHz da região a campo baixo da *Dd27Fd<sub>ox</sub>* com as ressonâncias marcadas de A a Q (com supressão do pico da água), e estudo do comportamento das mesmas com a temperatura. 158
- Figura VI.11.** Espectros NOESY 2D de RMN de próton, a 400MHz, da região a campo baixo da *DdFd27<sub>ox</sub>* em <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O ( pH 7.6), 300K. A- tempo de mistura de 5ms. B – tempo de mistura de 10ms. 159
- Figura VI.12.** Representação em estéreo das estruturas das ferredoxinas de *P.aerogenes* (linhas finas) e de *D.desulfuricans* Norway (linhas grossas). A geometria exacta e posição relativa dos dois agregados

- [4Fe-4S], encontram-se estritamente sobrepostas para ambas as proteínas. As duas proteínas diferem significativamente na região do "loop" que contém os resíduos 23-30. 161
- Figura VI.13.** Melhor ajuste para a equação  $\delta = a \sin^2(\theta) + b \cos(\theta) + c$ , que relaciona os desvios hiperfinos dos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> dos resíduos cisteicos coordenantes de *Dd27Fd*<sub>ox</sub> obtidos por RMN, com os correspondentes ângulos diedros Fe-S-C $\beta$ -H de *PaFd*, obtidos a partir da sua estrutura de raios-X. Na figura encontram-se assinalados os prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> de cada uma das cisteínas coordenantes de *Dd27Fd*, com excepção de um dos prótons  $\beta$  da cisteína 11, para o qual se desconhece o valor do desvio químico. 163
- Figura VII.1.** O vector pT7-7. 175
- Figura VII.2.** Esquema geral da purificação da ferredoxina II recombinante de *Dg* (*DgFdII*<sub>rec</sub>). Os tampões indicados referem-se aos tampões de eluição das colunas. GC – Gradiente Contínuo. GD – Gradiente Descontínuo. 177
- Figura VII.3.** Gel de 17.5% poliacrilamida/SDS (corado com azul de Coomassie) de ambos os estados oxidados da *DgFdII*<sub>nat</sub> e *DgFdII*<sub>rec</sub>. **A** - Marcadores de peso molecular, **B** - *DgFdII*<sub>rec</sub> pura (estado oxidado), **C** - *DgFdII*<sub>nat</sub> pura (estados oxidado). 179
- Figura VII.4.** Espectro de absorção UV/Visível do estado oxidado da *DgFdII*<sub>rec</sub>. A proteína encontra-se dissolvida em tampão fosfatos 50mM, pH 7.6 + 150mM NaCl.  $A_{412nm}/A_{305nm} = 0.8$ . 181
- Figura VII.5.** Espectro de RPE da *DgFdII*<sub>rec</sub>. **A** – Estado oxidado **B** – Estado reduzido por adição de ditionito de sódio (multiplicado por um factor 20). Os espectros foram adquiridos a uma temperatura de 12K; ganho de  $20 \times 10^3$ ; amplitude de modulação de 4.06Gpp; frequência de 9.66GHz e potência de 0.63mW. 183
- Figura VII.6.** Espectro completo de RMN de próton a 600MHz (com supressão do pico da água). Expansão da região a campo baixo de ambos os estados oxidados da *DgFdII* nativa e recombinante. **A** – Estado oxidado da *DgFdII*<sub>nat</sub>. **B** – Estado oxidado da *DgFdII*<sub>rec</sub>. As ressonâncias estão designadas **a-d** para a proteína nativa e **a'-d'** para a recombinante a partir da região a campo baixo expandida. 184
- Figura A.1.** **A** – Analogia clássica do spin electrónico, como um movimento de rotação do electrão em torno de si mesmo. **B** – Orientações possíveis do spin electrónico. **C** – Desdobramento dos níveis de energia de spin electrónico na presença de um campo magnético externo estático. **D** – Experiência de RPE. 193
- Figura A.2.** Diagrama de desdobramento a campo zero para vários estados de spin semi-inteiro. 198

**Figura A.3.** Acoplamento ferromagnético e antiferromagnético em centros binucleares de ferro. Em baixo são indicados os valores possíveis de spin total ( $S$ ) do centro, consoante os estados de oxidação de cada átomo de ferro.

200

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela I.1.</b> Parâmetros característicos das ferredoxinas. AF: antiferromagnético. pvm: par de valência mista. n.d. – não determinado.	14
<b>Tabela I.2.</b> Agregados heterometálicos sintetizados a partir de ferredoxinas; a.FdII de <i>D.gigas</i> b.FdIII de <i>D.africanus</i> c.Fd de <i>Pyrococcus furiosus</i> .	19
<b>Tabela I.3.</b> Valores da constante da acoplamento B para centros [Fe-S] contendo pares de valência deslocalizada.	25
<b>Tabela II.1.</b> Resumo dos parâmetros de RMN e atribuição específica dos prótons dos resíduos cisteicos coordenantes para o estado nativo da DgFdII. $\delta$ (ppm) – Desvio químico obtido a 300K e 400MHz. $\delta_{cont}$ (ppm) – Média dos desvios químicos de contacto para os prótons $\beta$ -CH <sub>2</sub> dos resíduos cisteicos. O desvio químico de contacto para cada um dos prótons foi obtido por subtração de 2.8ppm ao respectivo desvio químico. n.d – não determinado.	67
<b>Tabela III.1.</b> Resumo dos parâmetros espectrais de RMN e atribuição das ressonâncias dos prótons das cisteínas coordenantes, para ambas DgFdII <sub>ox</sub> e DgFdII <sub>int</sub> , a 300K. n.d. – não determinado.	94
<b>Tabela III.2.</b> Comparação dos valores de ângulo diedro $\theta$ ( Fe-S $\gamma$ -C $\beta$ -C $\alpha$ ) para a DgFdII <sub>ox</sub> e DgFdII <sub>int</sub> . Os valores foram obtidos a partir da estrutura de raios-X para o estado oxidado, e do processo já descrito nesta secção resultante das figuras III.6 e III.7. para o estado intermediário.	98
<b>Tabela IV.1.</b> Valores obtidos para as variáveis consideradas no modelo de acoplamento de spins para o DgFdII <sub>int</sub> , em três diferentes casos em que se consideram valores para as constantes de acoplamento da ordem dos 400, 300 e 200 cm <sup>-1</sup> respectivamente, e que representam o melhor ajuste à curva representativa dos valores de desvio químico dos prótons $\beta$ -CH <sub>2</sub> das cisteínas 8, 14 e 50 e a sua dependência com a temperatura.	111
<b>Tabela IV.2.</b> Valores obtidos para as variáveis consideradas no modelo de acoplamento de spins para o DgFdII <sub>ox</sub> , em três diferentes casos em que se consideram valores para as constantes de acoplamento da ordem dos 400, 300 e 200 cm <sup>-1</sup> respectivamente, e que representam o melhor ajuste à curva representativa dos valores de desvio químico	

---

dos prótons $\beta$ -CH <sub>2</sub> das cisteínas 8, 14 e 50 e a sua dependência com a temperatura.	114
<b>Tabela V.1.</b> Desvios isoméricos e desdobramentos de quadrupolo dos três sítios Fe em diferentes agregados que possuem agregados de valência mista.	130
<b>Tabela VI.1.</b> Resumo dos parâmetros espectrais de RMN a 300K e pH 8.0, e atribuição específica mais provável das ressonâncias dos prótons das cisteínas que coordenam os agregados I e II de [4Fe-4S] em <i>Dd27Fd<sub>ox</sub></i> . n.d.- não determinado.	162
<b>Tabela VII.1.</b> Breve caracterização da ferredoxina II de <i>Desulfovibrio gigas</i> recombinante ( <i>DgFdII<sub>rec</sub></i> ).	187

## **CAPÍTULO I**

### **As Ferredoxinas. Proteínas simples contendo centros [Fe-S]**



## **As Ferredoxinas. Proteínas simples contendo centros [Fe-S]**

I. Introdução	4
I.1. Centros [2Fe-2S]	6
I.2. Centros [3Fe-4S]	7
I.3. Centros [4Fe-4S]	10
I.4. Centros [3Fe-4S] + [4Fe-4S]	11
I.5. Centros 2 x [4Fe-4S]	15
I.6. Dinâmica estrutural entre centros [3Fe-4S] e [4Fe-4S]	17
I.7. Centros heterometálicos [M,3Fe-4S]	18
I.8. Propriedades electrónicas dos centros [Fe-S]	20
I.9. Aspectos recentes dos centros [Fe-S]	26
I.9.1. Novos agregados	27
I.9.2. Funções biológicas	34
I.9.2.1. Funções catalíticas	34
I.9.2.2. Funções sensoriais	36
I.9.2.3. Manutenção de subunidades	38
I.9.2.4. Outras funções	38

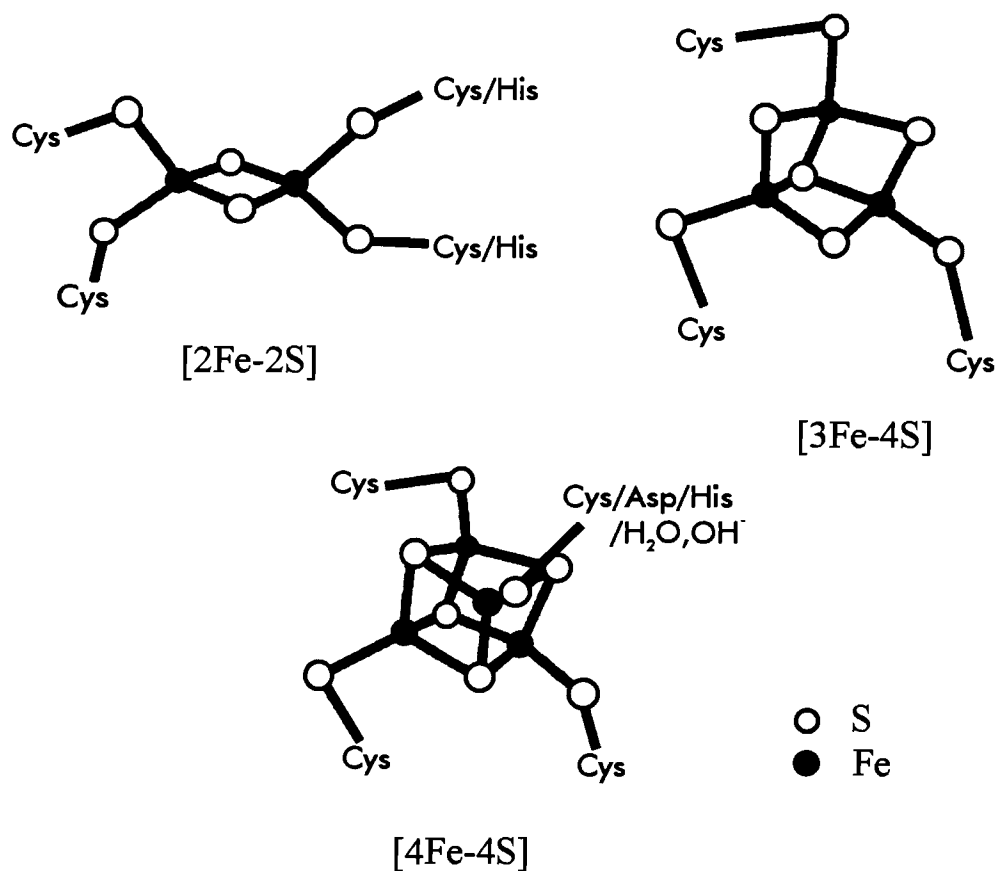
I.10. A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) aplicada aos centros [Fe-S]	39
I.10.1. Noções teóricas	41
I.10.1.1. O desvio hiperfino isotrópico	41
I.10.1.2. A relaxação de spin	46
I.10.1.3. O Efeito Nuclear de Overhauser (NOE)	48
I.10. Bibliografia	51

## I.1. Introdução

As ferredoxinas (Fd) são proteínas não hémicas que estão inseridas num grande grupo de proteínas, denominadas proteínas de ferro-enxofre, as quais são caracterizadas pela presença de centros polimetálicos contendo iões sulfeto e iões ferro, podendo apresentar vários estados de oxidação. O termo ferredoxina foi utilizado pela primeira vez no princípio dos anos sessenta [1], quando foi reconhecida [2] a função deste tipo de proteínas como transportadores electrónicos em sistemas biológicos. Desde então o conhecimento acerca destas proteínas tem crescido de uma forma exponencial [3-5].

As ferredoxinas são classificadas relativamente ao tipo de centro ou agregado [Fe-S] que constitui o grupo prostético. Assim, três tipos de centros podem ser encontrados; centros [2Fe-2S], provenientes de Fd de plantas e animais, e centros [3Fe-4S] e [4Fe-4S], tipicamente originárias de fontes bacterianas. Este tipo de proteínas pode ainda conter dois agregados do tipo 3Fe/4Fe ou 4Fe/4Fe, originando as ferredoxinas 7Fe e 8Fe, respectivamente. Os átomos de ferro que constituem cada um dos tipos de centro, funcionam também como blocos construtores de enzimas mais complexas e encontram-se tetraedricamente coordenados por átomos de enxofre, sendo a sua ligação à cadeia polipeptídica feita pelos mesmos átomos de ferro, coordenados a um átomo de enxofre cisteico [6-10], ou em alguns casos átomos de azoto ou oxigénio [11].

As ferredoxinas são caracterizadas por cadeias polipeptídicas pequenas (massas moleculares da ordem dos 6-10kDa) com baixo conteúdo em amino ácidos aromáticos e elevado em resíduos acídicos. Apresentam espectros de absorção UV/Visível com bandas de transferência de carga nas regiões dos 300 e 400nm, e ainda espectros de Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE) típicos para os estados oxidado e reduzido.



**Figura I.1.** Estruturas básicas dos agregados [Fe-S] em ferredoxinas

As técnicas de cristalografia de raios-X, absorção de raios-X, RPE, RMN, ENDOR, Mössbauer, CD, MCD, absorção óptica e ressonância de Raman, têm sido importantes na caracterização biológica dos centros de ferro-enxofre, complementarizando-se de forma a fornecerem uma descrição detalhada das propriedades electrónicas, magnéticas e estruturais dos mesmos. Resultados obtidos por alguns destes estudos, apontam para várias funções que não a oxidoreductiva já anteriormente estabelecida [12,13], como sejam as de ligação e activação de substratos, estabilização de radicais e estruturas, protecção de proteínas a ataques

enzimáticos, armazenamento de ferro e enxofre, sensores de ferro, dioxigénio, ião superóxido ( $O_2^-$ ) e possivelmente ácido nítrico ou ainda como proteínas de ligação ao DNA envolvido na expressão dos genes. Uma análise mais detalhada sobre esta matéria será exposta na secção I.9.

### I.1. Centros [2Fe-2S]

Os centros [2Fe-2S] podem normalmente ser encontrados em dois estados redox; o oxidado e o reduzido. O estado oxidado  $[2Fe-2S]^{+2}$ , é caracterizado por dois átomos de  $Fe^{+3}$  com  $S=5/2$  que se encontram antiferromagneticamente acoplados, dando um estado fundamental diamagnético com  $S_t=0$  [14], podendo tornar-se paramagnético à temperatura ambiente com o aumento das populações dos estados excitados. O estado reduzido  $[2Fe-2S]^{+1}$ , possui duas valências localizadas, evidenciadas por parâmetros de Mössbauer, onde um átomo de  $Fe^{+2}$  com  $S=2$  e outro  $Fe^{+3}$  com  $S=5/2$  se encontram também antiferromagneticamente acoplados, dando origem a um estado fundamental paramagnético com  $S_t=1/2$ , com um sinal de EPR característico centrado a  $g=1.94$  [14].

Foram recentemente observados estados totalmente ferrosos de um agregado  $[2Fe-2S]^0$ , em ferredoxinas isoladas de plantas, reduzidas com um complexo macrocíclico de Cr(II), que permanece coordenado à proteína após a primeira redução envolvendo um electrão [15], e cujas propriedades do estado fundamental não foram ainda determinadas.

Este tipo de centros caracteriza-se por ter potenciais redox na ordem dos 300 a -460mV e estão presentes numa vasta gama de ferredoxinas, as quais são características de plantas e animais, estando a sua função biológica neste tipo de proteínas apenas confinada ao transporte electrónico.

## I.2. Centros [3Fe-4S]

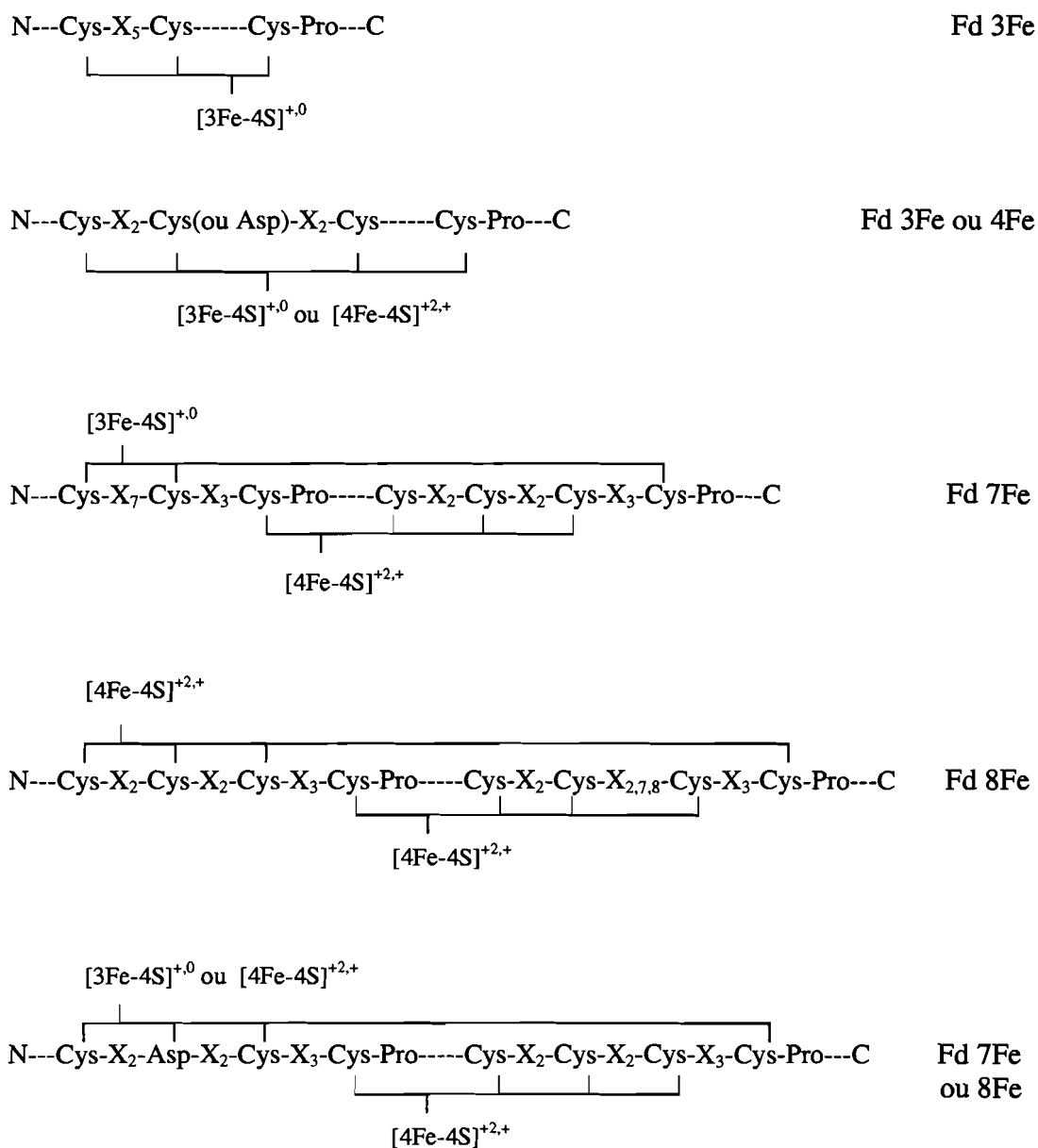
O agregado [3Fe-4S] foi identificado pela primeira vez na proteína de 7Fe de *Azotobacter vinelandii* FdI, em 1980 como resultado de estudos de Mössbauer [16]. Desde então, vários estudos elucidativos das propriedades magnéticas e electrónicas, bem como estudos estruturais (raios-X), têm sido feitos em proteínas que contêm este tipo de centros. Entre estes há a salientar os estudos detalhados de RPE [17-21], Mössbauer [18,22,23], Ressonância de Raman [24], MCD [25], EXAFS [26], Susceptibilidade Magnética [27], electroquímica [28], RMN [29-32] e cristalografia de raios-X [33] da ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas*, um dos poucos exemplos de ferredoxinas contendo um só centro [3Fe-4S], no estado nativo. Em solução, este centro pode ser estabilizado nos estados de oxidação  $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$  e  $[3\text{Fe-4S}]^0$ , tendo sido também conseguida por técnicas electroquímicas em filme, uma redução total do centro ao estado de oxidação  $[3\text{Fe-4S}]^{-2}$  [28,34,35], no qual os três átomos de ferro se encontram no estado de oxidação +2. Este estado parece ser característica comum a este tipo de agregados, tendo já sido observado em estudos de voltametria cíclica realizados em outras proteínas contendo centros [3Fe-4S] [36-39]. Estes estudos indicam que a redução do agregado  $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$  a  $[3\text{Fe-4S}]^{-2}$ , ocorre com a inclusão de três prótons, sendo os átomos de enxofre que servem de ponte entre dois átomos de ferro ( $\mu_2$ -S), os candidatos mais prováveis para aos sítios de protonação [39]. De particular interesse é o passo de redução  $[3\text{Fe-4S}]^0 \rightarrow [3\text{Fe-4S}]^{-2}$ , que funciona como um processo cooperativo envolvendo dois electrões, passando por um estado putativo  $[3\text{Fe-4S}]^{-1}$  (Tabela I.1.), com  $S=5/2$ , cujas propriedades electrónicas foram deduzidas a partir do fragmento do agregado equivalente em agregados  $[\text{Zn}, 3\text{Fe-4S}]^{+1}$  [40]. Esta espécie quando associada com iões metálicos, bem como a espécie  $[3\text{Fe-4S}]^0$  coordenam-se fortemente a estes para formar complexos heterometálicos do tipo  $[\text{M}, 3\text{Fe-4S}]$ , descritos na secção I.7.

No estado  $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$ , os três átomos  $\text{Fe}^{+3}$  com  $S=5/2$ , encontram-se antiferromagneticamente acoplados originando um estado fundamental  $S_t=1/2$  [16,22,41]. Observa-se assim um sinal de RPE quase isotrópico centrado a  $g=2.02$  [22,42]. A redução por um electrão a um potencial  $E_m=-130\text{mV}$ , gera um estado  $[3\text{Fe-4S}]^0$ , o qual é constituído por um par de valência mista  $2x\text{Fe}^{+2.5}$ , com  $S=9/2$ , e um ião férrico com  $S=5/2$ , acoplados antiferromagneticamente, que explica o estado fundamental deste sistema, caracterizado por MCD como tendo um spin inteiro  $S_t=2$ . O espectro de RPE deste estado reduzido, aparece como um sinal bastante alargado, a cerca de  $g=12$ , originado por uma transição  $\Delta m_s=4$  [23]. Por fim, o estado  $[3\text{Fe-4S}]^{-2}$ , pode ser gerado a partir do estado  $[3\text{Fe-4S}]^0$ , numa etapa que envolve dois electrões, a um potencial de  $-720\text{mV}$ , num processo dependente do pH [28,34,35].

Podem ser vários os motivos de coordenação deste tipo de agregado à cadeia polipeptídica, dependendo do tipo de ferredoxina em questão, ou seja, ferredoxina 3Fe ou ferredoxina 7Fe, tal como se pode verificar na Figura I.2. Pela análise desta figura, podemos verificar que é uma característica comum o facto de nem todos os ligandos cisteicos se encontrarem próximos na sequência de amino ácidos, sendo por vezes utilizados ligandos bastante distantes entre si para o mesmo agregado, mesmo havendo em alguns casos um ligando mais próximo disponível.

A localização de um resíduo Pro, imediatamente após o distante resíduo Cys é também uma característica interessante. Estes padrões são naturalmente condicionados pelo enrolamento da cadeia polipeptídica da proteína. Numa base dos padrões de distribuição dos ligandos cisteicos numa proteína ou sequência peptídica, é frequentemente possível prever o número e disposição dos potenciais agregados Fe-S nas proteínas. Este facto pode ser utilizado como uma vantagem na análise de proteínas complexas, para as quais não se conhece ainda a estrutura tridimensional e onde o elevado número de resíduos cisteicos faz

com que não seja fácil saber, quais deles funcionam como ligandos, bem como o número e tipo de agregado(s) coordenado(s) ao fragmento ou subunidade.



**Figura I.2.** Motivos de coordenação dos centros [3Fe-4S] e [4Fe-4S] à cadeia polipeptídica dos diferentes tipos de ferredoxinas (Figura reproduzida de [13]).



### I.3. Centros [4Fe-4S]

Este tipo de agregados podiam até há pouco ser somente encontrados em três estados diferentes de oxidação;  $[4\text{Fe-4S}]^{+3}$ ,  $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$  e  $[4\text{Fe-4S}]^{+1}$ , não se conhecendo, no entanto, exemplos de agregados [4Fe-4S] que em condições fisiológicas possuam um ciclo redox abrangendo os três estados de oxidação. Estudos recentes [43], referem que o agregado  $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$  na nitrogenase com ferro, pode ser reduzido na ausência de ditionito de sódio, ao estado totalmente ferroso  $[4\text{Fe-4S}]^0$ , utilizando citrato de Ti (III) (bem como o redutor fisiológico, flavodoxina e metilviologénio). Estas observações foram recentemente comprovadas por estudos de Mössbauer e RPE, que referem o agregado  $[4\text{Fe-4S}]^0$  com um estado fundamental  $S=4$  [44]. Esta descoberta revela-se de importância crucial, uma vez que levanta a possibilidade da proteína de ferro actuar como doador concertado de dois electrões para a proteína MoFe, que levaria a uma reavaliação completa do mecanismo catalítico da nitrogenase.

Destacam-se dois tipos de ferredoxinas possuidoras deste tipo de centro. Os estados de oxidação +2 e +1 são característicos das ferredoxinas de baixo potencial, com potenciais de oxidação-redução entre 0 e  $-645\text{mV}$ , podendo os estados de oxidação +3 e +2 ser encontrados nas ferredoxinas de alto potencial, denominadas HiPIP, as quais apresentam potenciais de oxidação-redução da ordem dos  $+50$  a  $+450\text{mV}$ .

O agregado  $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$ , comum aos dois tipos de ferredoxinas, é característico das ferredoxinas de baixo potencial no seu estado oxidado ou nativo e das HiPIP no seu estado reduzido. Este estado é caracterizado por um sistema composto por dois pares de valência mista;  $2 \times (2\text{xFe}^{+2.5})$  originados pela deslocalização electrónica dos pares formais  $\text{Fe}^{+3}\text{-Fe}^{+2}$ , acoplados antiferromagneticamente entre si, e com momentos magnéticos angulares paralelos dentro de cada par, que explica o facto de ser silencioso em RPE a baixa temperatura

apresentando um estado fundamental com  $S_t=0$ . À temperatura ambiente, observa-se um carácter paramagnético, que advém do aumento da população de spins dos estados excitados [3,45].

Por redução do estado anterior com um electrão, obtém-se o estado  $[4\text{Fe-4S}]^{+1}$ , característico unicamente das ferredoxinas de baixo potencial. Este estado reduzido é consistente com um modelo composto por um par de valência mista  $2\text{xFe}^{+2.5}$  (formalmente  $\text{Fe}^{+3} - \text{Fe}^{+2}$ ) com  $S=9/2$ , e outro ferroso  $2\text{xFe}^{+2}$  com  $S=4$ , acoplados antiferromagneticamente entre si, originando um sistema no seu estado fundamental com  $S_t=1/2$  [46,47]. Esta espécie dá origem a um sinal rômico de RPE com valores de  $g=2.07$ ,  $1.94$  e  $1.91$ . Uma excepção a esta "regra", verifica-se no entanto para a recentemente isolada ferredoxina de *Pyrococcus furiosus*, um organismo hipertermófilo [48]. Esta proteína apresenta o quarto ligando cisteico (Cys 14), que coordena o centro  $[4\text{Fe-4S}]$  substituído por um aspartato ou grupo hidroxilo. Como consequência, verifica-se o aparecimento no espectro de RPE na região  $g=5$  de sinais adicionais, resultando assim numa mistura de spins  $S=1/2$  (20%) e  $S=3/2$  (80%).

Finalmente, o estado  $[4\text{Fe-4S}]^{+3}$ , presente somente nas HiPIP, é explicado pelo acoplamento antiferromagnético de um par de valência mista  $2\text{xFe}^{+2.5}$  com  $S=9/2$ , com um par férrico  $2\text{xFe}^{+3}$  com  $S=4$ , originando um estado com spin global  $1/2$  [49-51]. No espectro de RPE desta espécie é observado um sinal axial com valores de  $g_{\parallel}=2.12$  e  $g_{\perp}=2.04$ .

#### I.4. Centros $[3\text{Fe-4S}] + [4\text{Fe-4S}]$

As normalmente designadas ferredoxinas de 7Fe, são proteínas que contêm dois tipos de centro [Fe-S]; um centro  $[3\text{Fe-4S}]$  e outro  $[4\text{Fe-4S}]$ , cuja existência foi já confirmada por RPE [52], MCD [52], Mössbauer [16], RMN [53-56] e cristalografia de raios-X [57,58].

Podem-se distinguir dois grupos diferentes pertencentes às ferredoxinas de 7Fe [59]; o tipo *Desulfovibrio*, que possui sete resíduos cisteicos e o tipo *Azotobacter*, no qual a sequência de amino ácidos que coordenam o primeiro agregado é única, C(X)<sub>2</sub>ZK(X)<sub>3</sub>C(X)<sub>3</sub>CPVXZ- (Z é normalmente substituído por C), enquanto o segundo tem a sequência de amino ácidos típica das ferredoxinas – C(X)<sub>2</sub>C(X)<sub>2</sub>C(X)<sub>3</sub>CP-. Uma outra característica destas ferredoxinas é a longa extensão C-terminal da cadeia polipeptídica de cerca de 30 a 50 resíduos, quando comparada com a das ferredoxinas do tipo *Desulfovibrio* [59].

Muitas destas ferredoxinas de 7Fe têm sido caracterizadas durante os últimos anos, onde entre as mais bem caracterizadas podemos encontrar o tipo *Azotobacter*, isoladas de bactérias como sejam: *Pseudomonas (Ps) putida* e *Ps.ovalis* FdI [60], *Ps.stutzeri* FdI [61], *Mycobacterium smegmatis* FdI [57], *Thermus aquaticus* subsp. *Thermophilus* Fd [62], *Streptomyces griseus* Fd [63], [58], *Bacillus schlegelli* Fd [64], *Rhodopseudomonas palustris* Fd [53], *Ps.nautica* Fd [54] e *A.vinelandii* FdI [57,58,65,66], e cujas sequências N-terminal são apresentadas na Figura I.3.

AvFd	AFVVTDN	IK	KYTD	VEV	PVD	FYEGPNFLVIHPDE	ID	AL	EPE	PAQAIFSEDE	60
PpFdI	AFVVTDN	IK	KYTD	VEV	PVD	FYEGPNFLVIHPDE	ID	AL	EPE	PAQAIFSEDE	60
PsFd	TFVVTDN	IK	KYTD	VEV	PVD	FYEGPNFLVIHPDE	ID	AL	EPE	PAQAIFSEDE	60
RcFdII	TYVVTDN	IA	KYTD	VEV	PVD	FYEGENTLVIHPHE	ID	GV	EPE	PADAIRPDTE	60
MsFd	TYVIAEP	VDVKDKA	IEE	PVD	FYEGPNFLVIHPDE	ID	GA	EPV	PVEAIYYED-	59	
SgFd	TYVIAQP	VDVKDKA	IEE	PVD	IYEGARLYI -HPDE	VD	GA	EPV	PVEAIFYEDD	59	
AaFd	PFVITSP	IGEKAAD	VET	PVD	AIHEGPDQYYIDPDL	ID	AA	EPV	PVNAIYQEEF	60	
TtFd	PHVICQP	IGVKDQS	VEV	PVE	IYDGGDQFYIHPDE	ID	GA	VPA	PVNAIYPEED	60	
SeFd	TYVIAEP	VDVLDKA	IEE	PVD	IYEGGRLYI -HPDE	VD	GA	EPV	PVEAIYYEDD	59	

**Figura I.3.** Sequência N-terminal de algumas ferredoxinas de 7Fe: Av=*A.vinelandii*, Pp=*Ps.putida*, Ps=*Ps.stutzeri*, Rc=*Rodobacter capsulatus*, Ms=*Mycobacterium smegmatis*, Sg=*Streptomyces griseus*, Aa=*Alicyclobacillus acidocaldarius*, Ti=*Thermus aquaticus* subsp.*thermophilus*, Se=*Saccharopolyspora erythrea*

O agregado [3Fe-4S] pode apresentar os estados de oxidação +1 e 0, ambos já caracterizados na secção I.2.2., enquanto que para o agregado [4Fe-4S] se podem observar os estados de oxidação +2 e +1 característicos das ferredoxinas de baixo potencial e que também foram já caracterizados na secção I.2.3. Este agregado de [4Fe-4S], encontra-se normalmente coordenado por quatro resíduos cisteicos, embora como também foi já referido para as ferredoxinas de 4Fe, um destes resíduos pode encontrar-se substituído por um aspartato, tal como se verifica na FdI de *D.africanus* [67,68].

Ambos os agregados presentes nestas ferredoxinas têm potenciais de redução consideravelmente diferentes com uma gama entre os +70 e os -420mV para o agregado [3Fe-4S] e outra de 0 a -645mV para o agregado [4Fe-4S] [3,69]. Os espectros de RPE das formas oxidada, parcialmente reduzida e totalmente reduzida das ferredoxinas de 7Fe de *A.vinelandii* e *T.thermophilus* são consistentes com os valores já referidos anteriormente. No estado oxidado ambos os espectros de RPE são característicos de centros [3Fe-4S]<sup>+1</sup>, com um sinal a  $g=2.02$ , enquanto que no estado parcialmente reduzido este sinal praticamente desaparece. A redução de ambos os centros dá origem a um espectro de RPE com um sinal complexo centrado a  $g=1.94$ , juntamente com uma ressonância fina a campo baixo pertencente ao centro [3Fe-4S]<sup>0</sup>. O sinal da região a  $g=2$  é atribuído ao estado de spin  $S=2$  deste centro, que interacciona via uma interacção fraca spin-spin com o estado de spin  $S=1/2$  do centro [4Fe-4S]<sup>+1</sup>. Estudos de MCD [52] confirmam a inexistência de conversão do centro [3Fe-4S] no centro [4Fe-4S], sobre condições redutoras.

**Tabela I.1.** Parâmetros característicos das ferredoxinas. AF: antiferromagnético. pvm: par de valência mista.

n.d. – não determinado

a) Calculado baseado nas cargas dos átomos de ferro e de enxofre inorgânico;  $S^{-2}$ .

b) Estado produzido electroquimicamente na superfície do eléctrodo

Tipo de Centro	Est.Ox.Global <sup>a)</sup>	$E^0$ (mV)	Est.Ox.Formais	Mod.Acopl.Spin/ $S_{total}$
[2Fe-2S] Fd	+2	-460 a -240	$2xFe^{+3}$	Acoplamento AF entre dois spins $S=5/2$ / $S_t=0$
	+1	n.d.	$Fe^{+3}, Fe^{+2}$	Acoplamento AF entre spins $S=5/2$ e $S=2$ / $S_t=1/2$ ou $9/2$
	0		$2xFe^{+2}$	n.d.
[3Fe-4S] Fd	+1	-420 a -50	$3xFe^{+3}$	Acoplamento AF entre par férrico, $S'=2$ ou $3$ e ião férrico $S=5/2$ / $S_t=1/2$
	0		$2xFe^{+3}, Fe^{+2}$	Acoplamento AF entre pvm $S'=9/2$ e ião férrico $S=5/2$ / $S_t=2$
	(estado putativo)			
	-1	-720 a -690	$Fe^{+3}, 2xFe^{+2}$	$S_t=5/2$
	-2		$3xFe^{+2}$ <sup>b)</sup>	n.d.
[4Fe-4S] HiPIP	+3	+50 a +450	$3xFe^{+3}, Fe^{+2}$	Acoplamento AF entre pvm $S'=9/2$ e par férrico $S'=4$ ou $3$ / $S_t=1/2$
	+2		$2xFe^{+3}, 2xFe^{+2}$	Acoplamento AF entre dois pvm $S'=9/2$ / $S_t=0$
		-645 a 0		
	+1		$Fe^{+3}, 3xFe^{+2}$	Acoplamento AF entre pvm $S'=9/2$ e par ferroso $S'=4$ / $S_t=1/2$ e/ou $3/2$
Fd	0		$4xFe^{+2}$	$S_t=4$

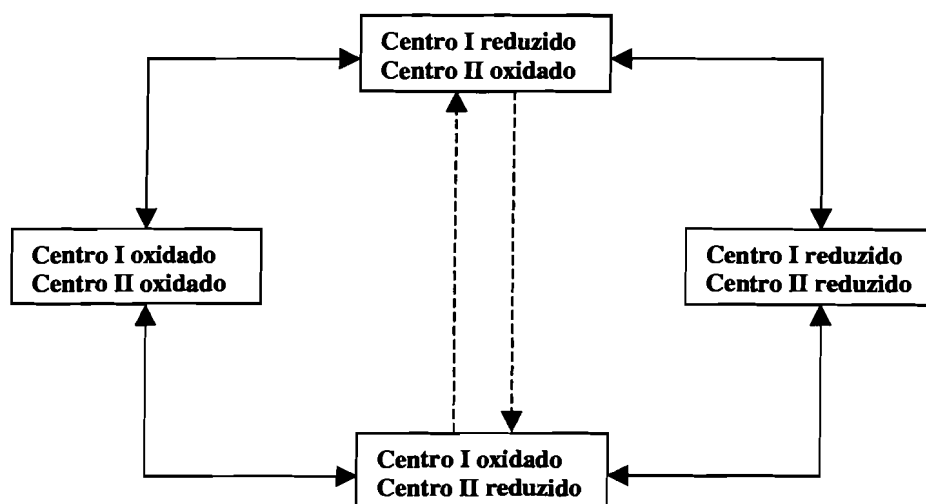
### I.5. Centros 2x[4Fe-4S]

As proteínas de ferro-enzofre que contêm este tipo de centros são designadas por ferredoxinas de 8Fe e são encontradas em numerosos organismos, nomeadamente em bactérias anaeróbicas e fotossintéticas, sendo utilizadas pelos organismos como transportadores electrónicos de baixo potencial, particularmente no metabolismo anaeróbio [3]. Estas ferredoxinas de baixo peso molecular supõe-se serem originárias da duplicação de um gene ancestral que codifica metade da estrutura primária [70]. Como resultado, a maior parte das ferredoxinas de 8Fe apresentam um eixo molecular com um enrolamento duplo, relacionando um dos agregados e resíduos vizinhos ao outro agregado e correspondentes resíduos [71-74].

Algumas das ferredoxinas de 8Fe isoladas de bactérias fotossintéticas, formam um grupo caracterizado pela presença de uma inserção de 6-8 resíduos de amino ácidos entre a segunda e terceira cisteínas do motivo de coordenação CxxCxxC (ver Figura I.2.), associado com o segundo agregado de [4Fe-4S] [75]. Menos características, estas proteínas têm nove cisteínas como potenciais ligandos dos agregados [4Fe-4S], embora o alinhamento das sequências sugira que a cisteína mais próxima do C-terminal não esteja envolvida na coordenação dos agregados [59]. A função destas proteínas não está ainda seguramente estabelecida, tendo-se no entanto obtido algumas evidências do envolvimento do produto da *fdxN* no sistema de fixação de Azoto de *Rhodobacter capsulatus* [76,77].

Ambos os agregados [4Fe-4S] podem ser encontrados nos estados de oxidação +2 e +1, caracterizados anteriormente na secção I.2.3, com valores do potencial de redução que variam entre os -400mV e  $\approx$ -500mV. Baseado na caracterização espectroscópica (RPE, RMN, e espectroscopia de Mössbauer) de algumas ferredoxinas de 8Fe, nomeadamente *Clostridium pasteurianum* (Cp) e *Clostridium acidi urici*(Cau) foi proposto um modelo redox como o apresentado na Figura I.4. [78].

Como resultado do estabelecido na Figura I.4., em que o equilíbrio representativo do processo intramolecular é um equilíbrio rápido, os espectros de RMN de próton das ferredoxinas de 8Fe no estado parcialmente reduzido, exibem ressonâncias alargadas intermédias entre as ressonâncias dos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> dos resíduos cisteicos dos estados totalmente reduzido e oxidado [79,80]. Uma excepção a esta situação encontra-se documentada para a ferredoxina de 8Fe de *Cv*, não tendo sido detectadas ressonâncias intermediárias entre os estados completamente oxidado e reduzido, provando a lenta, ou mesmo inexistente troca electrónica intramolecular numa ferredoxina com dois agregados [4Fe-4S], ligados por dois pentapéptidos CysxxxCys, possivelmente resultante de uma mudança da estrutura electrónica dos centros metálicos comparativamente com as ferredoxinas de *Cp* e *Cau* [81].

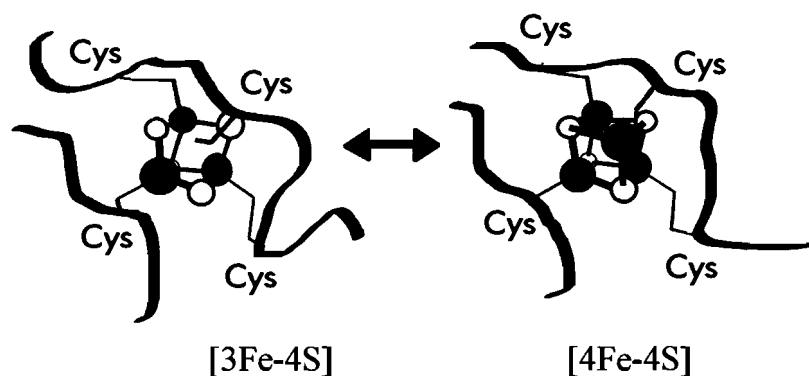


**Figura I.4.** Modelo redox representativo de uma ferredoxina  $2x[4Fe-4S]^{+2/+1}$ , tal como observado para as ferredoxinas de *Cp* e de *Cau*. As setas a cheio representam um equilíbrio lento, enquanto as setas a tracejado representam um equilíbrio rápido.

## I.6. Dinâmica estrutural entre centros [3Fe-4S] e [4Fe-4S]

As conversões de centros [3Fe-4S] em [4Fe-4S] e vice-versa, têm em conta processos químicos relativamente simples. A conversão de um centro de [4Fe-4S] num centro [3Fe-4S] pode ser conseguida utilizando um agente oxidante, como por exemplo o ferricianeto de potássio ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) [18], sendo o processo contrário de conversão de um centro [3Fe-4S] num centro [4Fe-4S], obtido em condições de anaerobiose e, na presença de um agente redutor (ex: ditioneitol) e de iões  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{S}^{-2}$  [3,42].

Vários estudos de interconversão entre os dois agregados foram realizados para o caso das ferredoxinas I e II de *D.gigas* [18], que contêm um agregado [4Fe-4S] e outro [3Fe-4S] respectivamente, e apresentam ambas a mesma sequência de amino ácidos. Verificou-se assim que incubando a *DgFdII* com ferro (95%  $^{57}\text{Fe}$ ) na presença de sulfito e de ditioneitol, o centro [3Fe-4S] era convertido num centro [4Fe-4S] ( $\text{Fd}_R$ ) com uma estrutura final idêntica ao obtido por adição de excesso de ferro e sulfito à apoproteína obtida a partir da *DgFdII*.



**Figura I.5.** Esquema representativo da conversão entre os centros [3Fe-4S] e [4Fe-4S]



Por tratamento da Fd<sub>R</sub> com ferricianeto, obtêm-se centros [3Fe-4S] idênticos aos da DgFdII. Estudos de reconstituição *in vitro* na DgFdII demonstraram ainda que a quantidade de agregado [4Fe-4S] formado é cerca de 2.5 vezes superior à de agregado [3Fe-4S], independentemente da concentração de ferro a que a apoproteína é exposta [82].

### I.7. Centros heterometálicos [M, 3Fe-4S]

A ocorrência na natureza de agregados heterometálicos foi já detectada em proteínas, como por exemplo na fosfatase púrpura do feijão de rim vermelho, com agregados do tipo [Zn,Fe] [83], no denominado centro M, um agregado possivelmente do tipo [M,6Fe] (M=Mo ou V), presente no cofactor metálico das nitrogenases [84], nas enzimas de níquel, que parecem conter um centro de Ni e Fe, ou ainda na desidrogenase de Co [85].

O escasso conhecimento das características destas estruturas na natureza e os resultados de interconversão de agregados obtidos para a FdII de *D.gigas*, levou à ideia de incorporação de outros metais ( $\text{Co}^{+2}$  [86],  $\text{Zn}^{+2}$  [87],  $\text{Ni}^{+2}$  [88],  $\text{Cd}^{+2}$  [40],  $\text{Ga}^{+3}$  [88]) em substituição do quarto átomo de ferro, dando origem a estruturas semelhantes aos centros [4Fe-4S], nas quais o estudo das propriedades electromagnéticas do agregado aparece mais simplificado, dada a possível existência de somente três sítios paramagnéticos em vez de quatro. O primeiro agregado heterometálico sintetizado foi o [Co,3Fe-4S] [86]. A incorporação de  $\text{Co}^{+2}$  ( $S=3/2$ ) no quarto lugar vago da DgFdII, dá origem a um agregado  $[\text{Co}, 3\text{Fe-4S}]^{+2}$ , constituído por um par de valência misto e um sítio  $\text{Fe}^{+3}$ , tal como sugerido por estudos de Mössbauer [86], com  $S=1/2$  e activo em RPE, com um sinal semelhante a um centro  $[\text{4Fe-4S}]^{+1}$ , mas com desdobramentos hiperfinos resultantes da presença de um átomo de cobalto com momento nuclear  $I=7/2$ . Foram também realizados vários estudos de RMN de

protão uni- e bidimensionais deste agregado heterometálico. Escassas foram no entanto as conclusões obtidas, em grande parte devido às elevadas larguras de linha dos sinais situados no envelope paramagnético do espectro, que dificulta grandemente, ou impossibilita mesmo a observação do Efeito nuclear de Overhauser (ver secção I.3.1.3.), nestas espécies. O estado reduzido  $[\text{Co}, 3\text{Fe-4S}]^{+1}$ , obtido por adição de um electrão ao  $\text{Fe}^{+3}$  do estado oxidado ( $E^\circ = -220\text{mV}$ ), e com provavelmente  $S=1$ , apresenta espectros de Mössbauer e de MCD característicos de sistemas com spin inteiro,  $S>0$  [42,89]. Embora a formação e os dados espectroscópicos deste agregado de cobalto, demonstrem a utilidade deste tipo de centro como sonda para o estudo do mecanismo sintético proposto, o paramagnetismo apresentado pelo cobalto, de modo algum simplifica o problema do magnetismo do quarto sítio do agregado. A introdução de uma espécie diamagnética (ex:  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  ou  $\text{Ga}^{+3}$ ), poderá ser assim um processo mais vantajoso relativamente a esta problemática.

**Tabela I.2.** Agregados heterometálicos sintetizados a partir de ferredoxinas;

a. FdII de *D.gigas* b.FdIII de *D.africanus* c.Fd de *Pyrococcus furiosus*

Agregado	Estado de Spin	$E^\circ$ (mV)
$^{a,c}[\text{Co}, 3\text{Fe-4S}]^{+2}$	1/2	-245 <sup>a</sup>
$[\text{Co}, 3\text{Fe-4S}]^{+1}$	>0 (int)	
$^{a,b,c}[\text{Zn}, 3\text{Fe-4S}]^{+2}$	2	-490 <sup>b</sup>
$[\text{Zn}, 3\text{Fe-4S}]^{+1}$	5/2	
$^{a,c}[\text{Ni}, 3\text{Fe-4S}]^{+2}$	3/2	-360 <sup>a</sup>
$^{a,b}[\text{Cd}, 3\text{Fe-4S}]^{+1}$	5/2	-495 <sup>a</sup> /-590 <sup>b</sup>
$^{b,c}[\text{Tl}, 3\text{Fe-4S}]^{+2}$	1/2	-80 <sup>b</sup>
$^b[\text{Cu}, 3\text{Fe-4S}]^{+2}$	1/2	
$[\text{Cu}, 3\text{Fe-4S}]^{+1}$	2	

A inserção de  $\text{Zn}^{+2}$  [87] no centro  $[\text{3Fe-4S}]$  da FdII de *D.gigas* implica um passo de redução prévio do centro 3Fe e um electrão extra para incorporação do metal, dando origem a um agregado  $[\text{Zn}, \text{3Fe-4S}]^{+1}$ . Estudos de Mössbauer sugerem a presença de um par deslocalizado  $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$  e um sitio ferroso. Sendo este agregado de zinco traduzido por um sistema de Krammer ( $S=5/2$ ), activo em RPE, o zinco incorporado terá forçosamente de ser bivalente ( $\text{Zn}^{+2}$ ).

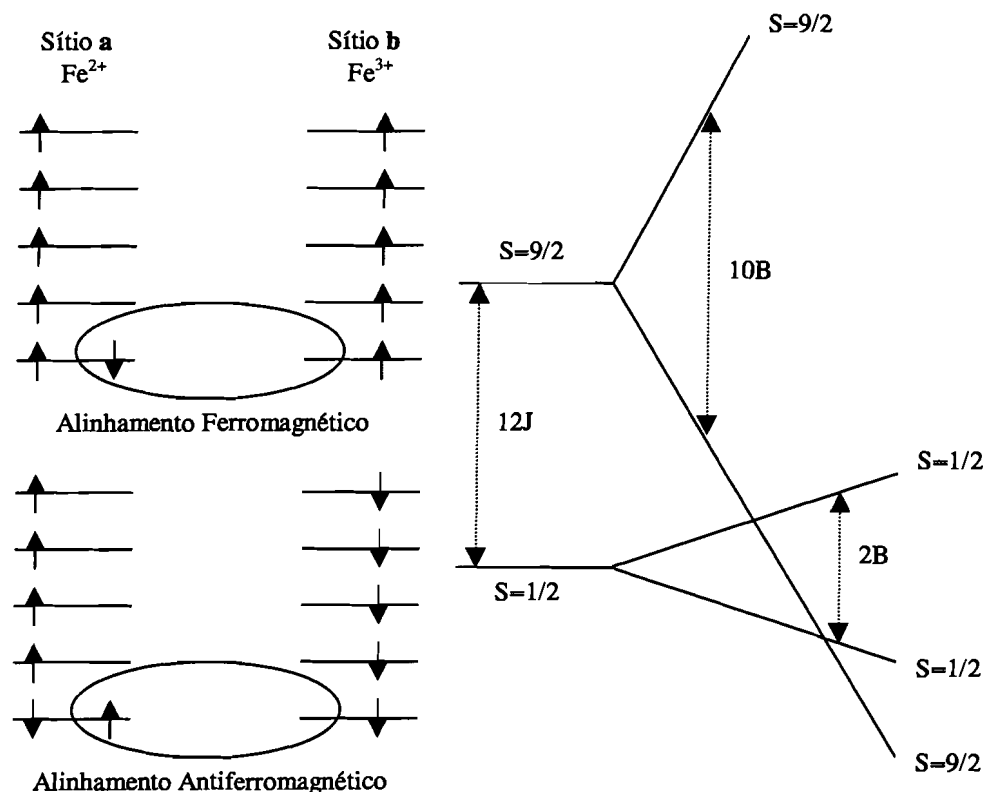
Estudos similares têm sido também realizados em *Pyrococcus furiosus* [90], a qual possui um centro de 4Fe com possibilidade de interconversão, com a inserção de  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  e recentemente  $\text{Tl}^{+}$  [91], e ainda em *D.africanus* FdIII (uma ferredoxina de 7Fe que contém um centro 4Fe e um 3Fe), com a incorporação de  $\text{Zn}^{+2}$  [92],  $\text{Cd}^{+2}$  [92],  $\text{Tl}^{+}$  [93] e  $\text{Cu}^{+2}$  [94].

## I.8. Propriedades electrónicas dos centros [Fe-S]

Em Biologia, ao caracterizar-se um sítio metálico paramagnético, é imperativo o conhecimento da sua estrutura electrónica, visto desta depender a sua reactividade [95].

De forma a compreender as propriedades dos estados fundamental e excitado dos agregados [Fe-S], bem como a cinética e termodinâmica do mecanismo de transferência electrónica entre estes [96], será necessário um conhecimento profundo da deslocalização de valência intra-agregado [95,97,98]. O fenómeno que origina estes sistemas de valências mistas deslocalizadas é denominado de deslocalização dependente do spin (DDS), que é uma versão da teoria "double exchange" desenvolvida por Zener [99], Anderson e Hasegawa [100]. Experimentalmente, a melhor maneira de ilustrar os efeitos do DDS será talvez por comparação dos espectros de Mössbauer dos vários agregados. Dado o desvio isomérico  $\delta$  de

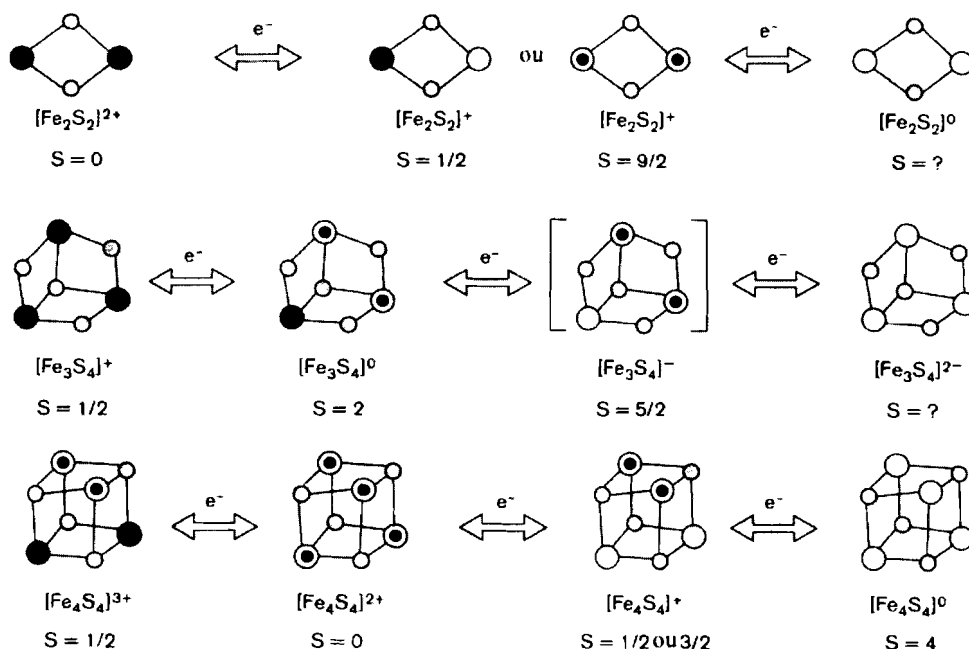
um espectro de Mössbauer de  $^{57}\text{Fe}$ , medir a densidade electrónica  $s$  no núcleo de ferro, e tendo em conta a coalescência dos electrões  $s$  e  $d$  devido à sua distribuição radial, então o valor de  $\delta$  irá fornecer uma boa medida da população de electrões  $d$ , sendo assim um bom indicador do estado de oxidação dos átomos de ferro nos agregados [Fe-S] [101]. A Figura I.6 ilustra a teoria de "double exchange", considerando um electrão numa orbital, deslocalizado entre os sítios metálicos  $a$  e  $b$ , de um dímero simétrico  $\text{Fe}^{+2}\text{Fe}^{+3}$ . Um dímero deslocalizado  $\text{Fe}^{+2.5}\text{Fe}^{+2.5}$ , pode ser visto como um dímero  $\text{Fe}^{+3}\text{Fe}^{+3}$  que contém um electrão deslocalizável adicional. Os spins dos cinco electrões  $d$  que ocupam cada um dos sítios  $\text{Fe}^{+3}$  estão alinhados paralelamente por fortes trocas intra-atómicas. À medida que o electrão deslocalizável, se encontra em cada um dos sítios metálicos, o seu spin fica antiparalelamente alinhado com o electrão da mesma orbital, devido ao princípio da exclusão de Pauli. Dado a deslocalização entre os dois sítios  $a$  e  $b$ , ser devida a interacções electróstáticas, verifica-se que a transferência ocorre sem mudança do alinhamento do spin do electrão deslocalizável, o qual induzirá um alinhamento paralelo dos spins dos dois sítios metálicos [95]. Foi também demonstrado que a ressonância por deslocalização num dímero de valência mista provoca uma separação de  $\pm B(S+1/2)$ , em que  $S$  é o spin do dímero e  $B$  a constante de acoplamento. Para um dímero  $\text{Fe}^{+2.5}\text{Fe}^{+2.5}$ , a constante de acoplamento  $B$ , pode ser escrita como  $B=\beta/5$ , em que  $\beta$  é o integral de transferência entre as duas orbitais dos sítios  $a$  e  $b$  que contém o electrão deslocalizável, e é equivalente ao integral de ressonância na teoria das orbitais moleculares de Hückel. Os sinais  $+$  e  $-$ , correspondem respectivamente, às combinações ligantes e anti-ligantes das orbitais dos dois metais.



**Figura I.6.** Deslocalização dependente do spin (DDS) para um dímero simétrico  $\text{Fe}^{+2}\text{Fe}^{+3}$ , descrevendo ambos os alinhamentos de spin ferromagnético e antiferromagnético. O acoplamento de spin de  $\text{Fe}^{+2}$  ( $S_a=2$ ) e  $\text{Fe}^{+3}$  ( $S_b=5/2$ ) pelo HDv  $V$  gera estados de spin do sistema  $S$ , com energias  $JS(S+1)/2$ . À direita são mostrados os estados de spin mais baixo ( $S=1/2$ ) e mais alto ( $S=9/2$ ) resultantes para valores de  $J>0$ . O sexto electrão pode estar localizado num dos sítios **a** ou **b**, pelo que cada multiplete de spin ocorre duas vezes. A deslocalização por ressonância deste sexto electrão (curva oval), mistura as configurações degeneradas  $\text{Fe}^{+2}\text{Fe}^{+3}$  e  $\text{Fe}^{+3}\text{Fe}^{+2}$ , provocando uma separação adicional  $\pm B(S+1/2)$ . A deslocalização é favorecida para o alinhamento de spins paralelo do estado  $S=9/2$  (topo), mas impedida para o estado  $S=1/2$ . (Tal como desenhado para a configuração antiferromagnética, os cinco spins remanescentes no sítio **a**, não representam um puro estado de spin  $S_a=5/2$  de um ião  $\text{Fe}^{+3}$ . A interacção por ressonância mistura somente configurações com o mesmo spin total. Estados com spin local  $S_a<5/2$  não são favoráveis, levando a uma redução da separação das ressonâncias para o estado  $S=1/2$ ). O diagrama da direita mostra que a DDS pode reverter a ordem dos estados de spin obtidos a partir da troca antiferromagnética. (Figura reproduzida de [95] )

Esta teoria foi mais tarde utilizada por Papaefthymiou e colaboradores [23] na designação de um Hamiltoniano de spin que permite a análise e correlaciona os dados obtidos por várias técnicas experimentais, nomeadamente as espectroscopias de Mössbauer e RPE. Outros modelos teóricos foram desenvolvidos [102-106], dos quais [106] desenvolveu um modelo teórico que tem em conta interações vibracionais e tende a localizar os electrões, reflectindo as situações encontradas em compostos reais um efeito recíproco delicado entre a DDS, e o acoplamento descrito pelo Hamiltoniano de Heisenberg-Dirac-van Vleck (HDv V),  $H=J.S_a.S_b$ , em que J é a constante de acoplamento de transferência. Assim, o Hamiltoniano de spin que descreve o acoplamento magnético entre dois centros metálicos virá afectado do termo  $\pm B(S+1/2)$ , que representa o termo de permuta dupla entre os dois iões metálicos que compõem o par de valência mista.

A Figura I.7 ilustra as estruturas, os estados de spin, S e os esquemas de valência deslocalizada para os estados de oxidação conhecidos dos diferentes agregados [Fe-S]. Como se pode verificar a estrutura rômica  $Fe_2S_2$  aparece como o bloco construtor básico dos agregados [Fe-S], sendo as propriedades electrónicas destas unidades a chave para compreender a deslocalização electrónica intra-agregados. Agregados  $[2Fe-2S]^{+1}$ , apresentam geralmente no estado fundamental um padrão de valência localizado com  $S=1/2$ . A única excepção é um agregado de uma proteína de *Clostridium pasteurianum*, na qual um ligando cisteico foi mutado para um ligando serina. Este agregado possui um estado fundamental com  $S=9/2$  [107], o qual foi demonstrado por espectroscopia de Mössbauer ser de valência deslocalizada [108]. Esta mesma técnica fornece também uma forte evidência de um par deslocalizado com  $S=9/2$  para o agregado  $[3Fe-4S]^0$ . Relativamente ao par deslocalizado do agregado  $[4Fe-4S]^{+3}$ , os resultados experimentais são um tanto ao quanto controversos [45,109-112]. A partir destes obtêm-se valores de  $S=9/2$  [109],  $S=7/2$  [110,111] e spin misto  $S=9/2, 7/2$  [112] para este par deslocalizado.



**Figura I.7.** Estruturas, estados de spin (S) e esquemas de valência deslocalizada para os estados de oxidação conhecidos dos agregados [2Fe-2S], [3Fe-4S] e [4Fe-4S]. S<sup>2-</sup> - cor cinzenta, Fe<sup>+3</sup> - cor preta, Fe<sup>+2</sup> - cor branca, Fe<sup>+2.5</sup> - cor branca com círculo ao centro preto ( Figura retirada de [113] ).

Um dos pontos essenciais para a interpretação quantitativa das propriedades magnéticas dos agregados [Fe-S], é o conhecimento do valor da constante de acoplamento B. Os valores experimentais conhecidos para este parâmetro são escassos, devido nomeadamente ao problema que advem do facto de ajustar valores experimentais a modelos que contêm vários valores desconhecidos. Verifica-se por exemplo, que a estrutura de spin dos agregados [4Fe-4S]<sup>+3</sup>, depende de seis valores de J e pelo menos um parâmetro B. Por fim, ter-se-á ainda que ter em conta que os parâmetros que descrevem mecanismos dinâmicos e de armadilhamento estático, influenciam o nível energético da estrutura em questão. O parâmetro B, pode ser obtido a partir da separação das combinações ligantes e anti-ligantes das orbitais

locais que contêm o electrão deslocalizado; a transição óptica entre estas duas orbitais resulta numa banda de intervalo (Figura I.6.). Na Tabela I.3. são apresentados valores de B, calculados a partir de técnicas experimentais como sejam a Susceptibilidade Magnética (SM) e o Dicronismo Circular Magnético a baixa temperatura (DCM).

**Tabela I.3.** Valores da constante da acoplamento B para centros [Fe-S] contendo pares de valência deslocalizada.

Agregado	B (cm <sup>-1</sup> )	Técnica experimental
[2Fe-2S] <sup>+1</sup>	~1000	MS [114]
	~800-900	DCM [95]
[3Fe-4S] <sup>0</sup>	~800-900	DCM [95]
[4Fe-4S] <sup>+1</sup>	~800-900	DCM [95]
[4Fe-4S] <sup>+3</sup>	~800-900	DCM [95]
[4Fe-4S] <sup>+3</sup> (sintético)	~10-600	MS [109,112]

Os valores obtidos para a constante B, estão de acordo com os obtidos para o caso dos agregados [4Fe-4S], utilizando cálculos de densidade funcional, com valores de B de 700-900cm<sup>-1</sup>, bem como para o caso do estado fundamental S=1/2 do agregado [2Fe-2S]<sup>+1</sup>, para o qual a espectroscopia de Mössbauer não exclui elevados valores para B.

Uma outra técnica potencialmente capaz de fornecer valores para as constantes de acoplamento B e J é a espectroscopia de RMN. O estudo de proteínas de [Fe-S] através desta técnica permite as atribuições específicas e estereoespecíficas dos protões β-CH<sub>2</sub> dos resíduos



cisteicos que coordenam os agregados metálicos [115] tal como é demonstrado ao longo desta tese. Conhecendo-se os tensores de acoplamento dos prótons, as constantes de acoplamento B e J poderão ser determinadas através das dependências de temperatura dos desvios químicos destes prótons. A densidade de spin do átomo de ferro ao qual está coordenado um resíduo específico, pode também ser determinada, podendo avaliar-se assim a distribuição de spins dentro do agregado [45]. Estudos de RMN demonstraram ainda que para agregados  $[4\text{Fe-}4\text{S}]^{+3}$ , coordenados a uma proteína, o par de valência deslocalizada pode residir em diferentes pares  $\text{Fe}_2\text{S}_2$  do agregado, e a uma escala de RMN ( $10^{-5}$  s), o agregado pode existir num equilíbrio rápido entre as diferentes formas [115]. Mais recentemente a mesma análise realizada por esta técnica, foi também utilizada para demonstrar mudanças nos esquemas de valência deslocalizada induzidas pela mutação dos resíduos cisteicos coordenantes em agregados  $[4\text{Fe-}4\text{S}]$ ; Cys→Ser para a HIPIP de *chromatium vinosum* [116] e Asp→Cys e Asp→Ser para a ferredoxina de *Pyrococcus furiosus* (Pf) [117], e a troca de um resíduo coordenante Aspartato por  $\text{CN}^-$  também em Pf [117]. Em ambos os casos, verificou-se que o átomo de ferro coordenado por um átomo de oxigénio (Serina e Aspartato) possui uma menor capacidade de ser reduzido e casos de valência deslocalizada homogénea foram somente observados para o átomo de ferro coordenado a  $\text{CN}^-$  e formas mutantes Asp→Cys da ferredoxina de Pf, que possuem o único sítio Fe como parte do par  $\text{Fe}^{+2}$ .

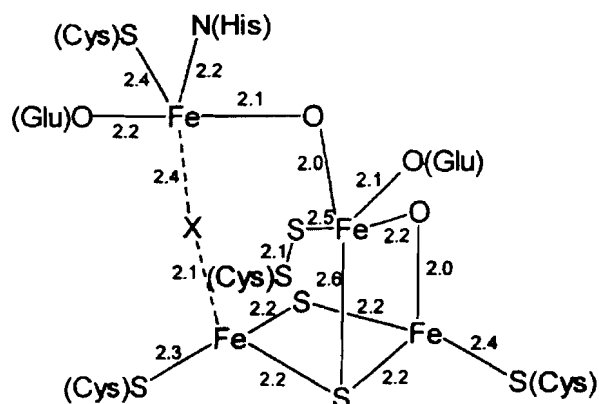
## I.9. Aspectos recentes dos centros [Fe-S]

Grandes mudanças na compreensão da estrutura, funcionalidade e propriedades dos agregados [Fe-S] ocorreram durante os últimos anos. Desde os novos estados redox com os agregados num estado de oxidação totalmente ferroso, já caracterizados nas secções

anteriores, à caracterização dos pares de valência deslocalizada de alguns estados redox dos diferentes tipos destes agregados, analisada na secção I.8., como ainda a novas estruturas e funções catalíticas, sensoriais e enzimáticas desconhecidas até há bem pouco tempo.

### ***1.9.1. Novos agregados***

Foram várias as novas estruturas de agregados [Fe-S] descobertas nos passados cinco anos. Uma das estruturas mais surpreendentes, trata-se sem dúvida de uma proteína isolada da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio vulgaris* [118]. Esta proteína contrariamente ao divulgado pelos estudos de RPE e Mössbauer que sugeriam uma proteína contendo um agregado prismático [6Fe-6S], possui dois agregados 4Fe distanciados de cerca de 12Å. Um deles é um convencional agregado [4Fe-4S] presente nos estados de oxidação +1 e +2, com a característica curiosa de ser o primeiro exemplo biológico a possuir no estado reduzido, um estado de spin-misto  $S=1/2$  e  $S=3/2$ . O outro agregado apresenta-se como um tipo de agregado híbrido sem precedentes com quatro pontes; duas  $\mu_2$ -S e duas  $\mu_2$ -O a coordenarem os átomos de ferro que se encontram coordenados à cadeia polipeptídica da proteína através de três resíduos cisteicos, uma cisteína persulfito, dois glutamatos monodentados e uma histidina (Figura I.8.). Embora não se conhecendo ainda a função desta proteína, a estrutura aberta deste novo agregado sugere que seja ele mesmo, o sítio activo. Um outro facto intrigante, resulta de que o átomo X da ponte Fe-X-Fe, que se apresenta parcialmente ocupado na estrutura cristalina, é identificado pela espectroscopia de Raman como um grupo oxo permutável com o solvente [118,119].

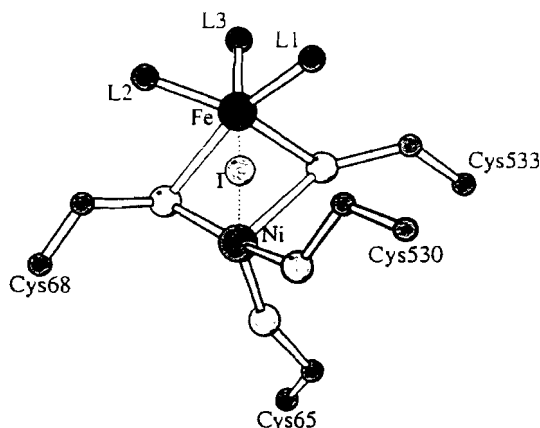


**Figura I.8.** Estrutura do agregado híbrido da proteína de ferro-enxofre de *Desulfovibrio vulgaris* ( Figura retirada de [113] ). As distâncias entre as ligações são dadas em angstroms.

Uma proteína com características semelhantes foi isolada de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, para a qual se realizou um estudo detalhado, incluindo uma caracterização espectroscópica por RPE e Mössbauer [120]. Uma reavaliação espectroscópica baseada no facto da proteína ser composta por dois agregados de [4Fe-4S] e não um de [6Fe-6S] como previamente se pensava, levou à obtenção de novos parâmetros espectroscópicos para os átomos de ferro, para a agora denominada fuscoredoxina [121].

Uma outra estrutura de certa forma peculiar retrata o sítio activo da hidrogenase de [NiFe] da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio gigas*. A estrutura de raios-X desta proteína [122] revela a existência de três centros ferro- enxofre, dispostos ao longo de uma linha praticamente recta na subunidade de 28 kDa, com um agregado [3Fe-4S] intercalado entre dois agregados [4Fe-4S]. O sítio activo (Figura I.9.), situado na subunidade de 60kDa, contém um par metálico heterodinuclear, constituído por um átomo de níquel e um agora identificado átomo de ferro [123], com a notável característica de possuir três ligandos

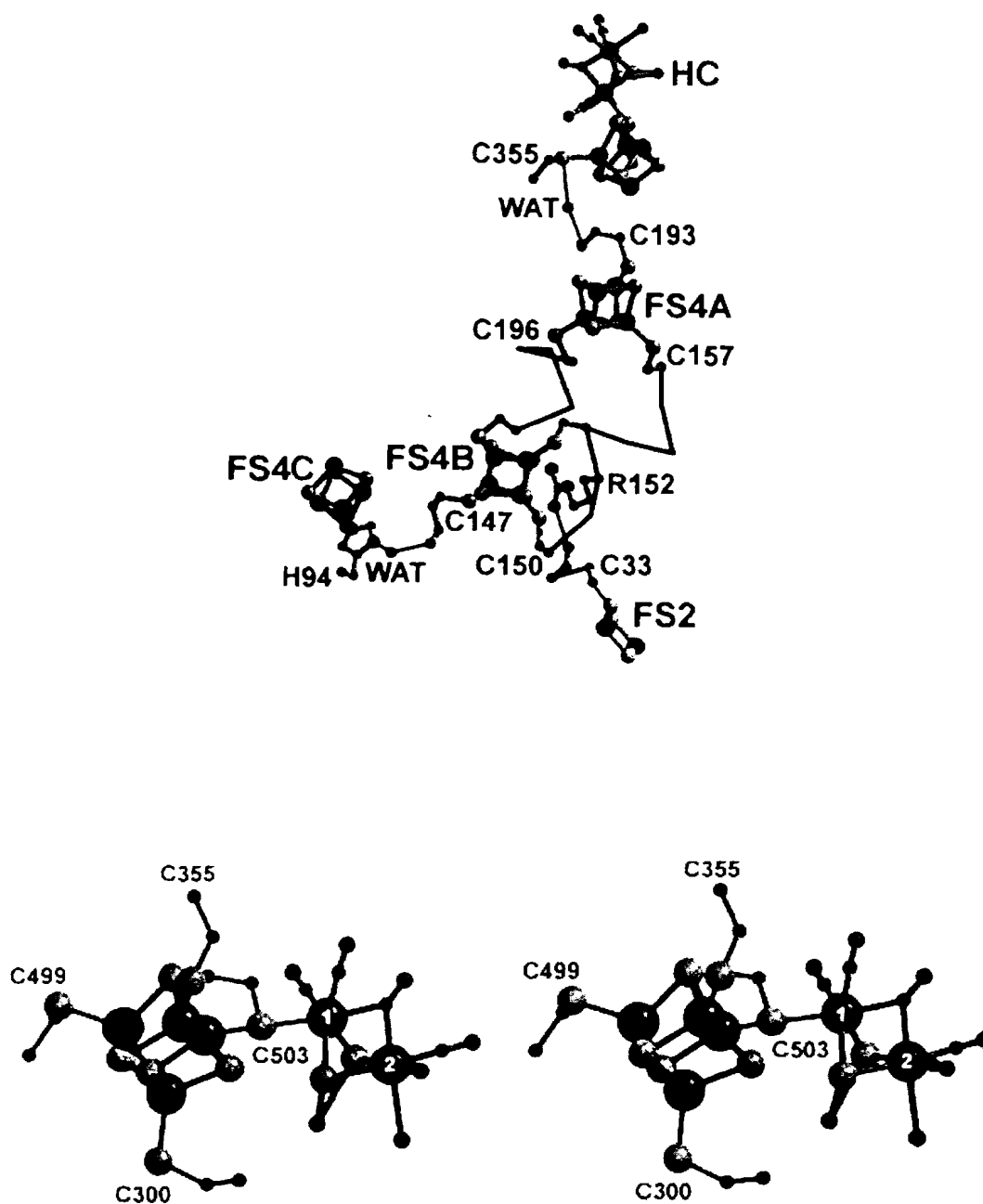
diatômicos ; um CO e dois CN<sup>-</sup> [124] ligados ao centro Fe, sendo o centro bimetalico NiFe, responsável pela activação do hidrogénio, coordenado covalentemente à proteína através de quatro ligandos cisteicos, dois dos quais coordenam também o átomo de ferro. Os átomos de ferro e níquel encontram-se ligados em ponte, muito provavelmente através de um ligando mono oxigenado derivado da redução de O<sub>2</sub>. Foi proposto um mecanismo para a ligação e clivagem do hidrogénio ao sítio activo, através da formação de um estado intermediário, no qual o hidrogénio se encontra ligado em ponte entre os átomos de níquel e ferro do sítio activo [123,125]. É ainda interessante referir que esta enzima retracts o processo de transferência electrónico, desde sempre associado aos agregados [Fe-S] de uma forma surpreendente. Na realidade os três agregados [Fe-S] estão alinhados quase linearmente na ordem [4Fe-4S], [3Fe-4S], [4Fe-4S] a partir do sítio activo Ni-Fe, no qual a reacção  $H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$  é catalizada. Esta justaposição na enzima dos quatro sítios que contêm metal parece ser indicativa do caminho para a passagem do electrão para o aceitador natural.



**Figura I.9.** Representação do sítio activo da hidrogenase [NiFe] de *Desulfovibrio gigas*. O ião Ni encontra-se coordenado por quatro resíduos cisteicos, dos quais dois servem de ligandos ponte entre o Ni e ião Fe. Os ligandos L1, L2 e L3, são ligandos não proteicos, correspondendo respectivamente a CO e CN, CN. A figura foi feita utilizando o programa MOLSCRIPT. ( Figura retirada de [123] )

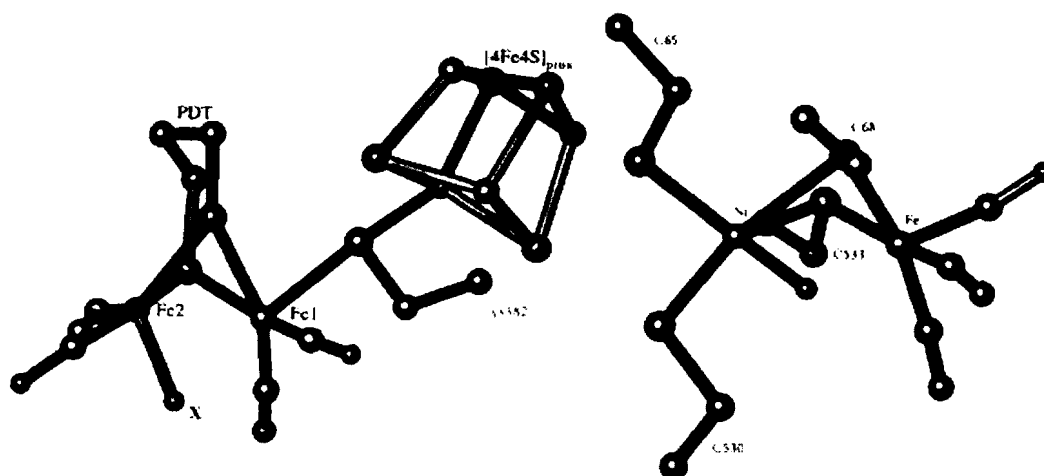
Foi ainda publicada a estrutura de raios-X de uma outra hidrogenase de [NiFe] de *Desulfovibrio vulgaris* [126], com um centro activo, um padrão global de enrolamento e um arranjo espacial dos centros metálicos muito similar aos encontrados na hidrogenase de *D.gigas*. A maior diferença entre estas duas proteínas reside nos três ligandos diatómicos, que são agora um SO e dois CO. Relativamente ao ligando ponte entre os átomos de ferro e níquel, embora não se exclua a possibilidade de ser um átomo de oxigénio, este fica como um segundo candidato relativamente ao enxofre.

O início deste ano, foi também bastante inovador relativamente às hidrogenases contendo só ferro. Tipicamente menos caracterizadas do que as estruturalmente não relacionadas enzimas de Ni-Fe [127] anteriormente mencionadas, estas enzimas são conhecidas por coordenarem pelo menos dois agregados [4Fe-4S] num domínio típico de ferredoxinas e possuírem um centro activo de [Fe-S] pouco usual, denominado de agregado H [127]. Foram publicadas duas novas estruturas de duas destas proteínas; as hidrogenases de [Fe] de *Clostridium pasteurianum* [128] e de *Desulfovibrio desulfuricans* [129]. Relativamente à hidrogenase de *Clostridium pasteurianum*, verificou-se que esta enzima era constituída por cinco agregados [Fe-S] distintos (Figura I.10). Verificou-se que o provável agregado que funciona como sítio activo, previamente denominado agregado-H (Figura I.10.), possui um inesperado arranjo de seis átomos de ferro, existindo sobre a forma de um sub-agregado cubano de [4Fe-4S] covalentemente ligado em ponte a um outro sub-agregado de [2Fe] por um grupo tiol pertencente a um resíduo cisteico. Este arranjo é substancialmente diferente de todos os agregados metálicos biológicos, compostos modelo e propostas de agregados observadas até a data [5]. O sub-agregado [2Fe], consiste em dois átomos de ferro octaetricamente coordenados (representados na Figura I.10. por 1 e 2), que conjuntamente contêm cinco ligandos CO/CN, três S (um dos quais é um átomo S cisteico), e um H<sub>2</sub>O. O outro sub-agregado de [4Fe-4S] encontra-se coordenado à proteína através de quatro cisteínas, uma das quais funciona como ponte de coordenação ao outro sub-agregado.



**Figura I.10.** Representação esquemática dos cinco agregados [Fe-S] da hidrogenase de [Fe] de *Clostridium pasteurianum*, com especial relevância para o sítio activo ou agregado H, do qual é apresentada uma perspectiva estéreo. ( Figura adaptada de [128] )

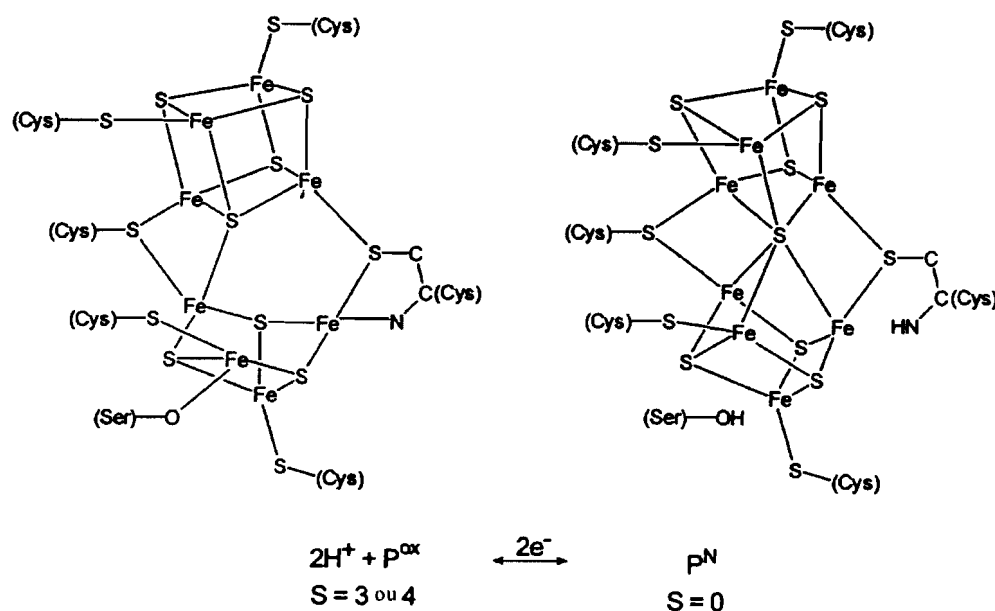
Similarmente ao referido para a hidrogenase de [Fe] de *Clostridium pasteurianum*, a hidrogenase de [Fe] de *Desulfovibrio desulfuricans* possui também um centro [2Fe], coordenado através do tiolato cisteico a um centro [4Fe-4S], que constituem o centro activo. A diferença relativamente aos dois centros activos das duas enzimas, reside precisamente no centro bimetálico. Neste caso da hidrogenase de [Fe] de *Desulfovibrio desulfuricans*, a coordenação dos dois átomos de ferro é algo diferente, dado que embora cada átomo de ferro coordene um ligando  $\text{CN}^-$  e um  $\text{CO}^-$  e ainda o ligando oxigénio monoatômico (representado por X na Figura I.11.), os dois encontram-se coordenados entre eles por dois grupos 1,3-propanoditiol que funcionam como ligandos ponte entre os dois átomos de ferro, ligação esta sem precedentes em centros biológicos [Fe-S] [129].



**Figura I.11.** Comparação dos sítios activos das hidrogenases de *Desulfovibrio desulfuricans* (à esquerda) e *Desulfovibrio gigas* (à direita). (Figura retirada de [129] )

De grande interesse são também as recentes estruturas de raios-X da nitrogenase de MoFe em dois estados de oxidação [130] e do complexo proteico proteína Fe-proteína MoFe [131], uma vez que sugerem um papel putativo para os agregados de [Fe-S] para o

acoplamento protónico e transporte electrónico, e uma visão mais profunda do mecanismo pelo qual a hidrólise do ATP está acoplada ao processo de transferência electrónica (ver secção I.9.2.). A estrutura cristalina do complexo proteína Fe-proteína MoFe confirma o papel do agregado P (Figura I.12.) na mediação da transferência electrónica entre o agregado de [4Fe-4S] da proteína de Fe e do agregado MoFe (sítio activo). Mais ainda se verifica que mudanças estruturais dependentes do pH do agregado P, apresentadas na Figura I.12., sugerem que a oxidação por dois electrões ao estado Pox, é acompanhado pelo movimento dos dois átomos de Fe com a ligação ao átomo de enxofre central a ser substituída por uma coordenação serinato e azoto amidico.



**Figura I.12.** Esquema representativo das mudanças estruturais que acompanham o processo oxidativo do agregado P da nitrogenase. ( Figura retirado de [113] ).

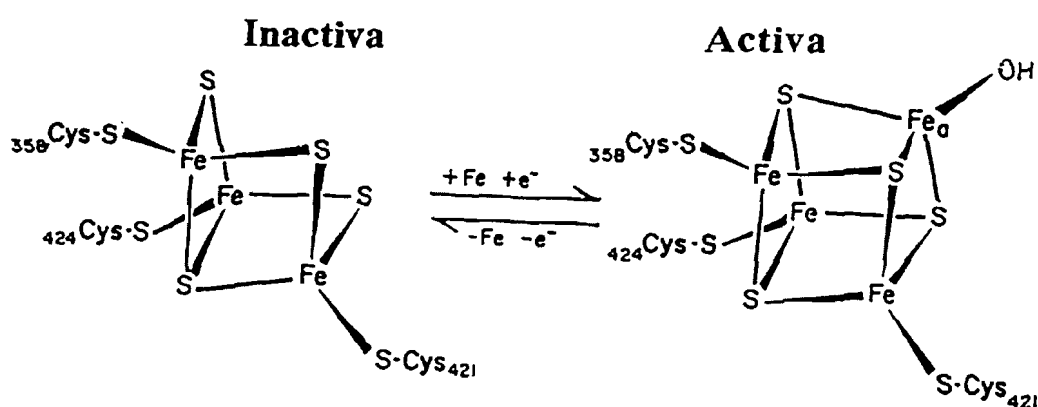


## 1.9.2. Funções biológicas

Desde cedo e durante largo tempo, se atribuiu unicamente a função de transportadores electrónicos aos centros de ferro-enxofre. Na realidade sempre se esperou que a combinação da versatilidade química do ferro e do enxofre, gerasse dispositivos ideais de aceitação, doação, deslocamento e armazenamento de electrões. No entanto durante os últimos anos outras funções de uma natureza não-oxidoreductiva têm emergido.

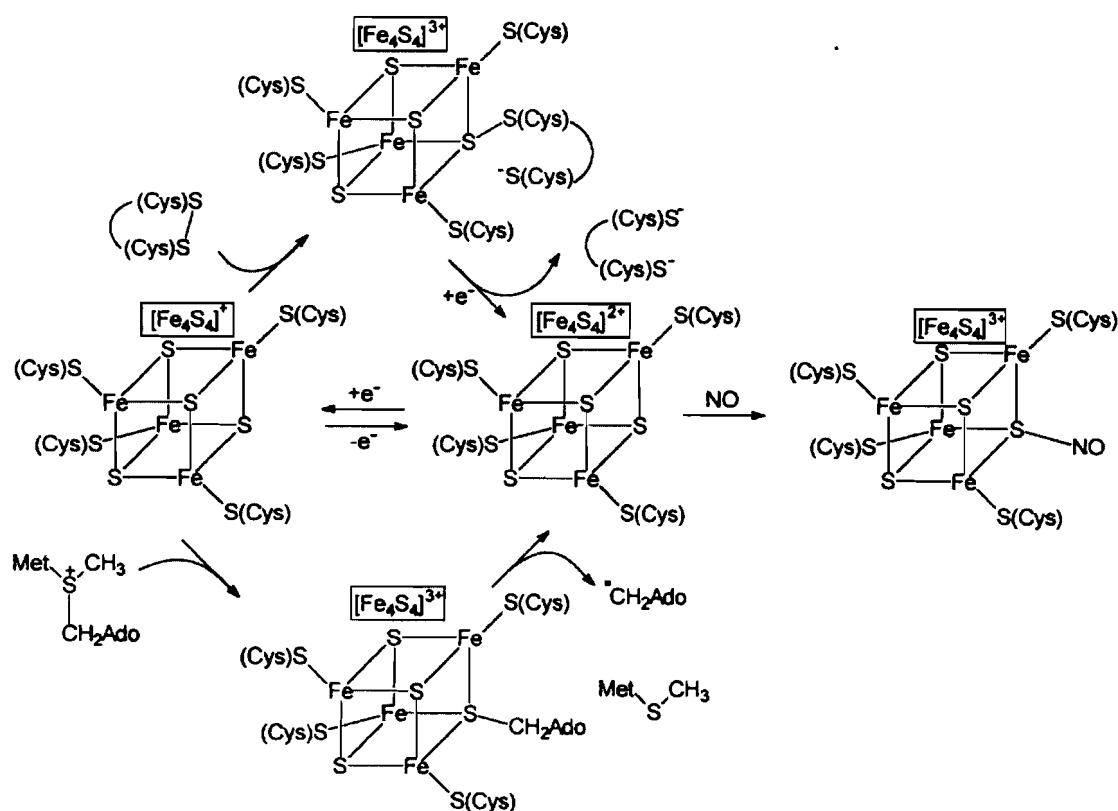
### 1.9.2.1. Funções catalíticas

Dentro destas podemos referir a coordenação e activação de substratos no único sitio de ferro na função catalítica da aconitase [132] e enzimas relacionadas [133]. O processo de activação da enzima aconitase envolve a conversão de um agregado [3Fe-4S] numa estrutura [4Fe-4S] na qual é restaurada o centro catalítico, com a inserção de um átomo de ferro lábil ao qual se liga o substrato (Figura I.13.).



**Figura I.13.** Descrição esquemática da interconversão de agregados representativos da forma inactiva e activa da aconitase (Figura adaptada de [132]).

Duas novas funções biológicas dos agregados [Fe-S] como catalisadores redox surgiram em 1997, e ao que parece envolvem também ambas química de agregados baseada no S, em oposição àquela baseada no Fe. A redutase da tioredoxina (Ferredoxina dos cloroplastos), demonstrou ser um novo tipo de redutase dissulfureto que aceita electrões de um doador mono-electrónico, uma ferredoxina de 2Fe, e possui um agregado  $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$  adjacente ao sítio activo dissulfureto cisteico. O papel do agregado parece ser o de estabilizar o grupo S-S cisteico reduzido com a incorporação de um electrão, por ligação covalente de uma das cisteínas, deixando a outra livre para atacar o dissulfureto substrato com formação de um intermediário hetero-dissulfureto.



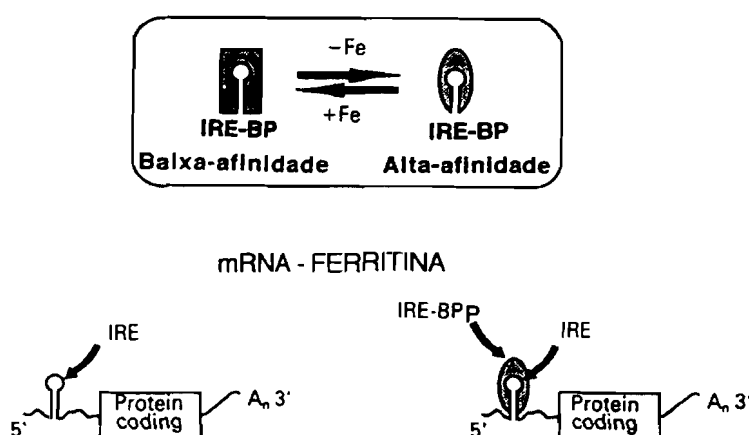
**Figura I.14.** Diferentes tipos de química baseada no átomo de S propostas para os agregados  $[4\text{Fe-4S}]$ , com os respectivos estados de oxidação formal apresentados dentro de caixas rectangulares (Figura retirada de [113]).

A recente caracterização da redutase hetero-dissulfureto em archaea metanogénicas leva a crer que este tipo de redução biológica do grupo S-S não está limitada aos cloroplastos [135]. Foram recentemente divulgadas duas outras enzimas a sintase da biotina em *E.coli* e a enzima activadora da liase-formato do piruvato [136,137], às quais foi reconhecido um novo papel catalítico, cuja função se processa por mecanismos radicalares, envolvendo quebra homolítica de ligações C-C e C-H, e ao que parece possuem agregados do  $[4\text{Fe-4S}]^{+2,+1}$  na interface de uma subunidade na sua forma activa. É de notar que o desconhecido mecanismo desta reacção que implica a redução do agregado  $[4\text{Fe-4S}]^{+2,+1}$  para o caso da enzima activadora da liase-formato do piruvato, só é possível na presença de S-adenosilmetionina (AdoMet), e é considerado o mecanismo Fe-S análogo da química tipo vitamina B12. No entanto, e tendo em conta o mecanismo da redutase da ferredoxina: tioredoxina, foi proposto um mecanismo baseado na química do S do tipo sugerido por Frey e Reed [138], ilustrado na Figura I.14.

### ***1.9.2.2. Funções sensoriais***

Uma das funções mais intrigantes destes centros, é a de servirem como sensores de ferro, ião super óxido ( $\text{O}_2^-$ ), e possivelmente óxido nítrico [139-143]. Parece existirem pelo menos dois tipos de modo de funcionamento sensorial. O primeiro, existente na proteína SoxR de *E.coli* [142,143], consiste na oxidação do agregado  $[2\text{Fe-2S}]^{+1}$  a  $[2\text{Fe-2S}]^{+2}$ , através do dioxigénio e fornece um sinal que activa um mecanismo de defesa contra o super óxido. Alternativamente a este, existe um mecanismo de dissociação-reassociação oxidativa do agregado que fornece um sinal de controle, como sucede na proteína FNR de *E.coli*, na qual o dímero activo dissocia-se em monómeros inactivos quando os agregados são destruídos [144,145]. Um outro exemplo deste tipo de mecanismo pode ser encontrado na

proteína reguladora de ferro, IRP-1 [139,140]. A associação de um agregado [4Fe-4S] na IRP1 ( "iron-responsive protein" ) para formar a aconitase citoplásmica resulta num mecanismo ferro-sensitivo nos mamíferos, revelador da mudança na conformação que previne a ligação do ARN mensageiro, controlando assim a transcrição dos receptores da ferritina e transferrina [132,134] (Figura I.15.). Ao que parece, este processo envolve a degradação do agregado [Fe-S] induzida pelo grupo NO e ocorre via um processo oxidativo envolvendo química de agregados baseada no S (Figura I.14.). O controlo dos níveis de ferro intracelular depende da função de duas proteínas: o receptor de transferrina, que reconhece esta proteína de transporte quando contém ferro e o lança nas células, e a proteína de armazenamento ferritina que funciona como local de armazenamento seguro e reversível do excesso de ferro. A concentração destas proteínas é regulada a um nível translaccional por um sistema engenhoso de controlo [95]. Ambos os sistemas da FNR e da IRP, fornecem oportunidades inequívocas para estudar os mecanismos de associação-dissociação de agregados [Fe-S] em sistemas biológicos. Relativamente à sensibilidade dos sensores, foi estabelecido que o agregado [4Fe-4S] na FNR "Wild type" é extremamente sensível ao dioxigénio. No entanto, uma mutação de um único amino ácido, estabiliza o agregado em cerca de 100 vezes [146].



**Figura I.15.** Esquema representativo da função ferro-sensorial da IRP-1. **IRE** – "Iron Responsive Element"  
**IRE-BP** – "Iron Responsive Element – Binding Protein".

### ***1.9.2.3. Manutenção de subunidades***

A nível estrutural, estes agregados possuem também a capacidade de estabilizar estruturas numa proteína, necessárias para algumas funções específicas da mesma. Como exemplos, podem citar-se o caso da proteína de ferro da nitrogenase [147] e do agregado  $F_x$  do Fotossistema I [148], onde por ligação dos ligandos cisteicos das diferentes subunidades, os centros Fe-S levam à formação de um dímero. Parece também ser este o caso da endonuclease III de *E.coli*, na qual um sítio específico de ligação ao DNA é estabilizado. Numa função relacionada com esta, os agregados Fe-S têm também demonstrado proteger as proteínas do ataque de proteases intracelulares, como se observa na amido transferase de *Bacillus subtilis* [149]. A estabilidade da enzima requer a presença de um agregado [4Fe-4S]. Quando a enzima é exposta ao dioxigénio in vivo, as taxas de desactivação e degradação proteica são as mesmas. A reacção destrutiva do dioxigénio com o agregado é considerada o passo de desactivação.

### ***1.9.2.4. Outras funções***

Por fim, conhecem-se ainda proteínas, nas quais os agregados de Fe-S são indispensáveis para a sua actividade biológica, desconhecendo-se no entanto o seu papel. Como exemplo temos a ferroquelatase de mamíferos [150,151] que insere ferro na protoporfirina durante o processo de biossíntese do hemo, ou ainda a proteína MutY de reparação do DNA na *E.coli* [152], que parece funcionar de forma semelhante à endonuclease III.

Os centros de ferro-enxofre podem ainda servir como locais de armazenamento de ferro e possivelmente de enxofre [153].

## **I.10. A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) aplicada aos centros paramagnéticos [Fe-S]**

As proteínas de ferro-enzofre foram das primeiras a ser estudadas utilizando a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) [154-156], e têm desde então sido objecto de variadíssimos estudos utilizando esta técnica. A utilização da RMN no estudo de metaloproteínas, encontra-se no entanto limitada pela sua elevada massa molecular e pela necessidade de utilizar amostras muito concentradas ( $\geq 1\text{mM}$ ).

Estas proteínas possuem um ou mais centros metálicos, os quais podem ser paramagnéticos, pelo facto de poderem conter um ou mais electrões desemparelhados, em pelo menos um dos seus estados de oxidação. Estes electrões desemparelhados interactuam com o núcleo por um mecanismo de contacto através das ligações químicas ou por um mecanismo de pseudo contacto através do espaço. Estas interacções provocam mecanismos de relaxação nuclear eficientes que alargam as ressonâncias e/ou originam ressonâncias com desvios hiperfinos, localizadas fora do envelope diamagnético (0-10ppm) normal para um dado tipo de spin. Este paramagnetismo é tanto mais sentido pelo protão, quanto mais próximo ele se encontre do centro metálico. O centro ferro-enzofre, no caso das ferredoxinas encontra-se coordenado à proteína através de ligandos cisteicos, pelo que as ressonâncias mais desviadas, localizadas na região paramagnética do espectro de RMN, correspondem aos protões  $\beta$ -CH<sub>2</sub> e  $\alpha$ -CH das cisteínas coordenadas ao átomo de ferro do centro [Fe-S]. O padrão de desvios químicos apresentado pelas diferentes cisteínas em diferentes proteínas reflecte assim algumas das propriedades do centro, como sejam; o estado de valência de cada um dos átomos de ferro [157], o tipo de mecanismo de deslocalização de spin e a orientação da cisteína relativamente ao ião ferro a que se encontra coordenada. Basicamente, todos os métodos de RMN aplicados a proteínas diamagnéticas [158-160], podem ser adaptados ao

estudo de proteínas paramagnéticas, tendo as diferenças a introduzir a ver com a presença de um ião paramagnético que infere à proteína grandes desvios químicos e curtos tempos de relaxação,  $T_1$  e  $T_2$ . (ver secções I.10.1.1. e I.10.1.2.)

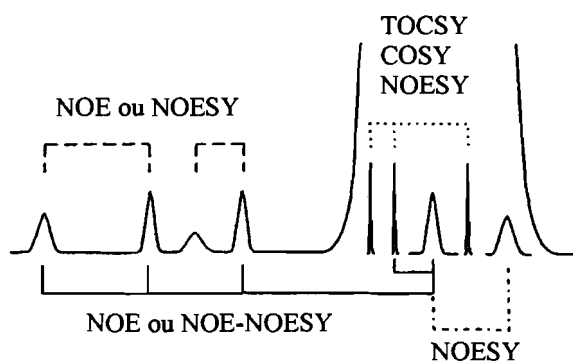
Um dos primeiros objectivos será então a atribuição específica das ressonâncias mais desviadas. Este processo começa por assumir que os sinais mais desviados no espectro RMN de próton de uma ferredoxina pertencem aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> e  $\alpha$ -CH dos ligandos cisteicos, para cada um dos quais os prótons  $\beta$  têm maiores desvios de contacto do que os respectivos prótons  $\alpha$  ( a atribuição dos prótons  $\beta$  e  $\alpha$  pertencentes ao mesmo resíduo amino ácido, é também confirmada pelo espectro NOESY 2D, através da intensidade dos picos cruzados ). Adicionalmente, as ressonâncias dos prótons pertencentes ao mesmo ligando cisteico de uma dada proteína, devem ter o mesmo tipo de dependência com a temperatura (*Curie* ou *anti-Curie*; ver secção I.10.1.1.). Baseados nestas suposições, os sistemas de spin dos prótons **a** e **b** para cada uma das cisteínas coordenantes, são identificados utilizando dados obtidos a partir de experiências homonucleares de RMN de 1D ou 2D, tais como:

- NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy): Utilizada para detectar relaxação cruzada entre pares de prótons desviados e entre prótons desviados e prótons diamagnéticos. São utilizados tempos de irradiação (mistura) curtos, da ordem dos valores de  $T_1$  dos dois spins interactuantes [161]. Fornece informação espacial entre prótons com  $d < 5 \text{ \AA}$ , uma vez que se baseia num efeito que é proporcional ao inverso da sexta potência da distancia (ver secção I.10.1.3.).

- COSY (Correlated Spectroscopy): Permite obter correlações escalares entre prótons

directamente acoplados, através de uma constante de acoplamento J.

- TOCSY (Total Correlation Spectroscopy): Permite obter correlações entre todos os prótons de um amino ácido, identificar e atribuir os sistemas de spin que os caracterizam.



**Figura I.16.** Possíveis experiências de RMN de próton de 1D e 2D a realizar numa proteína paramagnética de forma a obter correlações entre os vários tipos de sinais do espectro de RMN de 1D da mesma ( Figura reproduzida de [162] ).

Seguidamente, por comparação com uma estrutura cristalina conhecida, as atribuições específicas das ressonâncias dos prótons pertencentes aos ligandos cisteicos, são feitas a partir de NOE's detectados entre prótons cisteicos e prótons pertencentes a outros resíduos de amino ácidos.



### ***1.10.1. Noções teóricas<sup>a)</sup>***

#### ***1.10.1.1. O desvio hiperfino isotrópico***

O desvio químico isotrópico é definido como a componente do desvio químico de um dado spin nuclear, atribuído às interações entre o núcleo ressonante e os electrões desemparelhados. Assim, o desvio hiperfino isotrópico resulta da soma do desvio químico diamagnético, definido como o desvio apresentado pelo núcleo na ausência de um centro paramagnético, e do desvio químico isotrópico. Este desvio químico isotrópico tem duas componentes principais: o desvio de contacto ( $\delta_c$ ) e o desvio de pseudo contacto ( $\delta_{pc}$ ). O desvio de contacto deve-se à presença de densidade de spin no núcleo através da deslocalização electrónica ao longo das ligações químicas, enquanto o desvio de pseudo contacto é devido às interações dipólo-dipólo entre os spins dos electrões desemparelhados e o spin nuclear.

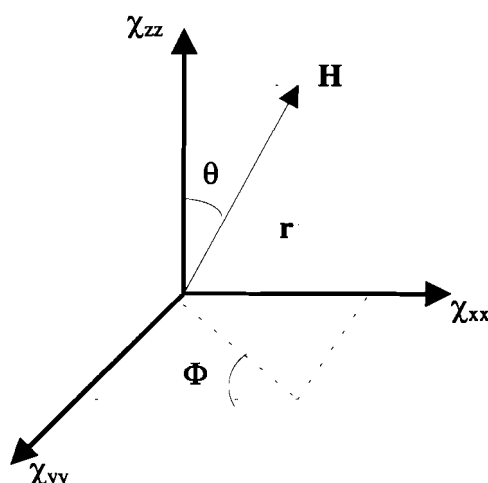
Considerando assim o acoplamento hiperfino entre um electrão desemparelhado, cujo momento magnético,  $\mu_s$ , é responsável pela denominada blindagem paramagnética, e um núcleo, este pode ser descrito como  $H = I \cdot \hat{A} \cdot S$ , em que  $I$  é o spin nuclear,  $S$  o spin electrónico e  $\hat{A}$  o tensor que descreve o acoplamento. A energia de interacção entre estes dois spins, é definida por:

$$E = \frac{\mu_o}{4\pi} \frac{\mu_I \mu_s}{r^3} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

---

<sup>a)</sup> Para uma análise mais detalhada e dedução de todas as equações apresentadas consultar as Ref. [45,163-166]

Como pode verificar-se esta energia é dependente do campo magnético exterior  $\mu_0$ , da distância  $r$  entre os dois spins, dos momentos magnéticos do electrão  $\mu_s$  e do núcleo  $\mu_I$ , bem como do ângulo  $\theta$  entre os vectores de spin e nuclear, que se encontra representado na Figura I.17.



**Figura I.17.** Relação entre o vector M-H, a estrutura de referência da proteína, e os eixos dos três cosenos directores que definem o tensor de susceptibilidade magnética,  $\chi$  ( Figura adaptada de [167] ).

Normalmente em solução, os termos  $3\cos^2\theta-1$  podem ser ignorados visto a sua média tender para zero. No entanto, sendo  $\mu_s = \sqrt{g_e^2 \mu_B^2 S(S+1)}$ , em que  $g$  para o electrão varia em solução, então o termo  $3\cos^2\theta-1$  não tenderá para zero e os desvios hiperfinos serão vistos. Esta interacção, como já foi referido anteriormente denomina-se desvio de pseudo contacto ( $\delta_{pc}$ ) e é representado pela seguinte expressão:

$$\delta_{pc} = \left( \frac{\Delta v}{v_0} \right) = \frac{1}{4\pi} \frac{1}{3N_A r^3} \left[ \chi_{zz} - \frac{1}{2} (\chi_{xx} - \chi_{yy}) (3\cos^2\theta - 1) + \frac{3}{2} (\chi_{xx} - \chi_{yy}) \sin^2\theta \cos^2 2\theta \right]$$

onde,  $\Delta\nu$  - média do desvio hiperfino,  $\nu_0$  - desvio químico de um núcleo referência,  $N_A$  - número de Avogadro,  $\chi_{xx}$ ,  $\chi_{yy}$  e  $\chi_{zz}$  - componentes espaciais do tensor de susceptibilidade magnética. Este tensor,  $\chi$  é anisotrópico, em parte devido à anisotropia dos valores de  $g$  do electrão.

Na realidade, o spin dos electrões desemparelhados não se localiza inteiramente no ião metálico, visto a deslocalização ocorrer via orbitais moleculares. Se esta deslocalização ocorrer, então a equação anterior não se mantém verdadeira. Existe também a possibilidade da densidade dos spins desemparelhados residir nos núcleos ressonantes, no caso das orbitais S estarem envolvidas na orbital molecular. Esta densidade de spin pode ser descrita como

$$H = AI \cdot S, \text{ em que } A \text{ é a constante de acoplamento de contacto e é definida como } A = K \frac{\rho}{2S},$$

$K$  é o desdobramento hiperfino e  $\rho$  a densidade de spin. Por aplicação de um campo magnético externo, o electrão tem  $2S+1$  orientações possíveis e, as transições entre estes níveis de energia dependem do tempo de relaxação do electrão. Quase sempre, os tempos de relaxação dos electrões são mais curtos do que os dos prótons, pelo que o próton vê na realidade uma orientação média, que resulta num momento magnético diferente de zero, em que existem orientações preferidas. Este momento magnético  $\mu$  é definido pela seguinte expressão:

$$\langle \mu \rangle = g\mu_B \langle S_z \rangle, \quad \text{com } \langle S_z \rangle = -S(S+1) \frac{g\mu_B B_0}{3KT},$$

em que  $T$  é a temperatura (K),  $B_0$  o campo magnético externo,  $\mu_B$  o magnetão de Bohr, e  $\langle S_z \rangle$  a magnetização de spin.

O desvio resultante, denominado desvio de contacto ( $\delta_c$ ) devido a esta deslocalização de densidade de spin ( $\sigma$  e  $\pi$ ) é então definido por:

$$\delta_c = \left( \frac{\Delta\nu}{\nu_0} \right) = \frac{A}{n\gamma_I B_0} \langle S_z \rangle = \frac{A}{n} S(S+1) \frac{g\mu_B}{3\gamma_I KT}$$

onde K é a constante de Boltzman, e  $\gamma_I$  a razão giromagnética nuclear. Como podemos observar, o desvio de contacto depende da temperatura e de S, que é informativo acerca do acoplamento em agregados de ferro. Os desvios de contacto podem ser observados até 4 ou 5 ligações a partir do átomo de metal, no qual se situam os electrões desemparelhados.

Em comparação com o desvio de contacto, o desvio de pseudo contacto é praticamente desprezável ao se interpretarem os desvios químicos hiperfinos das ferredoxinas. Assim, a dependência com a temperatura das ressonâncias mais desviadas, resulta de um desvio na distribuição de Boltzman dos níveis de spin magnético permitidos dos electrões desemparelhados. Uma interpretação da dependência com a temperatura apresentada por estas ressonâncias, foi já alvo de estudos prévios [14,168]. A lei de *Curie* prevê um decréscimo do valor absoluto de  $\langle S_z \rangle$  com o aumento de temperatura. As ressonâncias que seguem este tipo de comportamento com a temperatura denominam-se *Curie*. No entanto, verifica-se experimentalmente que algumas ressonâncias apresentam precisamente um comportamento oposto. Estas ressonâncias, cujo desvio isotrópico aumenta com o aumento de temperatura são denominadas *anti-Curie*. A temperatura suficientemente elevada, estes spins *anti-Curie* invertem o seu tipo de comportamento e aproximam-se do valor de desvio diamagnético, pelo que um spin *anti-Curie* possui também uma região com uma dependência de temperatura do tipo Curie a que se dá o nome de região *pseudo-Curie*.

### ***1.10.1.2. A relaxação de spin***

A relaxação electrónica é um parâmetro importante em RMN de espécies paramagnéticas, estando directamente relacionada com o tempo de correlação ( $\tau_c$ ), o qual é definido no processo de relaxação nuclear como:  $\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_s} + \frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{\tau_m}$ , onde  $\tau_s$  é o tempo de relaxação electrónica,  $\tau_r$  o tempo de correlação rotacional e  $\tau_m$  o tempo de permuta. Esta relaxação electrónica caracteriza-se como um processo bastante rápido em iões metálicos ( $10^{-8} - 10^{-13}$  s), provocando variações no campo magnético e induzindo a relaxação nuclear. No caso das ferredoxinas e outras proteínas de ferro-enzofre, o tempo de relaxação dos electrões ( $\tau_s$ ) varia entre  $10^{-9} - 10^{-11}$  s para o ião  $\text{Fe}^{+3}$  de alto spin (H.S) [169-171],  $10^{-11} - 10^{-13}$  s para o ião  $\text{Fe}^{+3}$  de baixo spin (L.S) [172,173], e  $10^{-11}$  s para o ião  $\text{Fe}^{+2}$  (H.S) [174], com larguras de linha de respectivamente 200-12000, 0.5-20 e 150 Hz.

Os outros dois mecanismos responsáveis pela relaxação nuclear, são o "*tumbling*" molecular, que induz um outro processo de relaxação denominado de relaxação *Curie*, e a permuta química. É de notar que estes três mecanismos de relaxação nuclear, acontecem na presença de electrões desemparelhados, pelo que na sua ausência outros quatro mecanismos são então responsáveis pela relaxação nuclear, nomeadamente os mecanismos de interacção dipólo-dipólo, rotação de spin, anisotropia de desvio químico e relaxação escalar (dois tipos).

Os mecanismos de contacto e dipolar são os processos mais importantes de relaxação nuclear, podendo a componente *Curie* ser desprezada. Os tempos de relaxação nuclear longitudinal,  $T_1$  e transversal,  $T_2$ , podem ser descritos pelas seguintes equações para cada um dos dois processos.

Para o processo dipolar:

$$T_1^{-1} = \frac{2}{15} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_I^2 g_e^2 \mu_B^2 S(S+1)}{r^6} \left[ \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_s)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_s)^2 \tau_c^2} \right]$$

$$T_2^{-1} = \frac{1}{15} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_I^2 g_e^2 \mu_B^2 S(S+1)}{r^6} \left[ 4\tau_c + \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_s)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_s)^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + \omega_s^2 \tau_c^2} \right]$$

Para o processo de contacto:

$$T_1^{-1} = \frac{2}{3} \left( \frac{A}{n} \right)^2 S(S+1) \left[ \frac{\tau_e}{1 + (\omega_I - \omega_s)^2 \tau_e^2} \right]$$

$$T_2^{-1} = \frac{1}{3} \left( \frac{A}{n} \right)^2 S(S+1) \left[ \frac{\tau_e}{1 + (\omega_I - \omega_s)^2 \tau_e^2} + \tau_e \right]$$

onde  $\tau_e$  é o equivalente de  $\tau_c$  para o caso do processo dipolar, visto o acoplamento por

contacto ser independente da rotação molecular, pelo que  $\frac{1}{\tau_e} = \frac{1}{\tau_s} + \frac{1}{\tau_m}$ .

De uma maneira geral, a análise da relaxação nuclear é um processo complexo para sistemas paramagnéticos contendo mais do que um ião metálico, onde o acoplamento antiferromagnético entre diferentes iões metálicos dá origem a novos níveis de energia de spin electrónico.

### ***1.10.1.3. O Efeito Nuclear de Overhauser (NOE)***

O efeito nuclear de Overhauser para um próton é definido como a variação fraccional da intensidade do sinal, quando um outro sinal ressonante é saturado. A intensidade deste efeito é proporcional ao recíproco da sexta potência da distância entre os núcleos irradiado e observado. A magnitude do NOE depende do campo magnético aplicado e do tempo de correlação para a interacção espacial entre os dois núcleos em questão. O efeito nuclear de Overhauser é assim uma interacção dipolar através do espaço, sendo a base de todo o trabalho estrutural em RMN de solução.

Toda a teoria relacionada com o NOE está largamente desenvolvida para sistemas diamagnéticos [175,176]. A teoria prevê maiores valores de NOE para macro-moléculas expostas a campos magnéticos mais elevados, comparando com moléculas pequenas em condições de limitação de movimentação extremas. No entanto, em macro-moléculas, deparamos com uma considerável difusão de spin, limitando assim a selectividade.

Sempre se assumiu que a presença de electrões desemparelhados numa molécula, neutraliza qualquer possível efeito de NOE, pelo que durante muito tempo não se realizaram estudos deste efeito em moléculas paramagnéticas. No entanto, os primeiros estudos em proteínas hémicas de ferro (III) (H.S. e L.S) demonstraram que o NOE pode ser detectado em sistemas com tempos de relaxação bastante curtos, tal como previsto por cálculos teóricos [177]. A magnitude do NOE depende do valor de relaxação intrínseca dos núcleos e do tempo de correlação para a interacção, pelo que para núcleos pertencentes a macro-moléculas e acoplados a electrão(s) desemparelhado(s) com tempos de relaxação curtos que possuam aumentos de relaxação nuclear moderados, até 50% do NOE é detectado. Uma das grandes vantagens do NOE em sistemas paramagnéticos é que os valores de relaxação nuclear elevadas eliminam os efeitos de difusão de spin, dando somente origem a efeitos primários de NOE, obtendo-se uma informação estrutural selectiva.

Verifica-se assim que o efeito do paramagnetismo no NOE se dá através dos efeitos de  $T_1$ , caracterizados na secção anterior deste capítulo. Se nos depararmos assim com um longo tempo de irradiação do protão J, comparativamente ao valor de  $T_1$  do mesmo (denominado de "Steady state NOE"), verifica-se que o NOE no protão I é dado pela expressão:  $\eta = \frac{\sigma_{IJ}}{\rho_I}$ , em

que o termo  $\sigma_{I(J)}$  representa a relaxação ( $\sigma_{I(J)} = \omega_2 - \omega_0$ ) cruzada, definida por:

$$\sigma_{IJ} = \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{n^2 \gamma_I^2 \gamma_J^2}{10r^6} \left[ \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_J)^2 \tau_c^2} - \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I - \omega_J)^2 \tau_c^2} \right]$$

O valor da relaxação,  $\rho_I$  ( $\rho_I = \omega_0 + 2\omega_I + \omega_2$ ), contém ambas as contribuições paramagnéticas e diamagnéticas;  $\rho_I = \sum_M \rho_{IM}^{para} + \sum_J \rho_{IJ}$  em que,

$$\rho_{IJ} = \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{n^2 \gamma_I^2 \gamma_J^2}{10r^6} \left[ \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I - \omega_J)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_J)^2 \tau_c^2} \right]$$

$$\rho_{IM}^{para} = \frac{2}{15} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right) \frac{\gamma_I^2 g_e^2 \mu_B^2 S(S+1)}{r_{IM}^6} \left[ \frac{7\tau_c}{1 + \omega_S^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} \right]$$

Esta última equação é a mesma do que a escrita na secção anterior para a relaxação dipolar  $T_1$ , apresentada unicamente para o caso em que a relaxação electrónica é dominante. No caso de  $\rho_I$  (o valor de  $T^{-1}$  do núcleo) ser dominado por  $\rho_{IM}^{para}$ , então  $\eta_{I(J)} = \sigma_{I(J)} T_{IM}^{-1}$ . Para espécies paramagnéticas, em que o NOE é independente do  $T_1$  do protão irradiado, a observação do NOE é mais fácil quando o protão a ser saturado, for aquele que relaxa mais rapidamente.



A experiência NOESY 2D é um exemplo de um NOE de curta duração. Neste caso, a equação simplificada que relaciona a magnitude do NOE com a relaxação cruzada será:

$$\eta_{I(J)} = \exp[-(\rho - \sigma_{I(J)}) t][1 - \exp(-2\sigma_{I(J)} t)]$$

No entanto, experimentalmente, a detecção de NOE em moléculas paramagnéticas apresenta alguns problemas. As linhas são difíceis de saturar, pelo que é necessário um desacoplador com elevada potência rf. Um forte pulso rf produz largos efeitos de "off-resonance" ao longo de praticamente todo o espectro. Esta situação pode causar problemas nas atribuições de NOE devido à dificuldade em discriminar entre NOE reais e efeitos de "off-resonance", pelo que normalmente se realizam mais do que uma medição com diferentes intensidades de desacoplamento (diferentes graus de saturação), de forma a obter uma atribuição com segurança.

Os esperados pouco intensos NOE requerem acumulação de um elevado número de scans. Embora o tempo total possa não ser muito longo, devido aos curtos tempos de reciclagem permitidos por uma relaxação nuclear rápida, a estabilidade do aparelho a longo termo é particularmente crítica neste caso; o desacoplador tem muitas vezes que trabalhar no seu valor máximo de intensidade, e uma elevada estabilidade em potência e um perfil de saturação simétrica são necessários para obter valores de confiança. A temperatura terá também de ser muito estável, visto os desvios químicos serem altamente dependentes da temperatura.

## I.11. Bibliografia

1. Mortenson, L. E., Valentine, R. C., and Carnahan, J. C. (1962) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **7**, 448
2. Arnon, D. I. (1965) *Science* **149**, 1460
3. Cammack, R. (1992) in *Adv.Inorg.Chem.* (Cammack, R., and Sykes, A. G., eds) Vol. 38, pp. 281-382, Academic Press, Inc.
4. Berg, J. M., and Holm, R. H. (1982) in *Iron-Sulfur Proteins* (Spiro, T. G., ed), pp. 1-66, Wiley-Interscience, New York
5. Holm, R. H., Kennepohl, P., and Solomon, E. I. (1996) *Chem.Rev.* **96**, 2239
6. Fukuyama, K., Matsubara, H., Tsukihara, T., and Katsube, Y. (1989) *J.Mol.Biol.* **210**, 383
7. Stout, C. D. (1989) *J.Mol.Biol.* **205**, 545
8. Stout, G. H., Turley, S., Sieker, L. C., and Jensen, L. H. (1988) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **85**, 1020-1022
9. Kissinger, C. R., Adman, E. T., Sieker, L. C., Jensen, L. H., and LeGall, J. (1989) *FEBS letters* **244**, 447
10. Fukuyama, K., Hase, T., Matsumoto, S., Tsukihara, T., Katsube, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Wada, K., and Matsubara, H. (1980) *Nature* **286**, 522
11. Holm, R. H. (1992) in *Advances in Inorganic Chemistry* (Cammack, R. a. S., A.G., ed) Vol. 38, pp. 281-322, Academic press, Inc.
12. *Iron-Sulfur Proteins* (Lovenberg, W., Ed.), I and II, (1973) Academic Press, New York
13. Johnson, M. K. (1994) in *Encyclopedia of Inorganic Chemistry* (King, R. B., ed) Vol. 4, pp. 1886-1915, John Wiley & Sons
14. Dunham, W. R., Palmer, G., Sands, R. H., and Bearden, A. H. (1971) *Biochim.Biophys.Acta* **253**, 373-384
15. Im, S.-C., Kohzuma, T., McFarlane, W., Gaillard, J., and Sykes, A. G. (1997) *Inorg.Chem.* **36**, 1388-1396
16. Emptage, M. H., Kent, T. A., Huynh, B. H., Rawlings, J., Orme-Johnson, W. H., and Münk, E. (1980) *J.Biol.Chem.* **255**, 1793-1796
17. Cammack, R., Rao, K. K., Hall, D. O., Moura, J. J. G., Xavier, A. V., Bruschi, M., LeGall, J., Deville, A., and Gayda, J. P. (1977) *Biochim.Biophys.Acta* **490**, 311-321

18. Moura, J. J. G., Moura, I., Kent, T. A., Lipscomb, J. D., Huynh, B. H., LeGall, J., Xavier, A. V., and Münck, E. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 6259-6267
19. Gayda, J. P., Bertrand, P., Theodule, F. X., and Moura, J. J. G. (1982) *J.Chem.Phys.* **77**, 3387-3391
20. Gayda, J. P., Bertrand, P., Guigliarelli, B., and Meyer, J. (1983) *J.Chem.Phys.* **79**, 5732-5733
21. Bertrand, P., Guigliarelli, B., Meyer, J., and Gayda, J. P. (1984) *Biochimie* **66**, 77-79
22. Huynh, B. H., Moura, J. J. G., Moura, I., Kent, T. A., LeGall, J., Xavier, A. V., and Munck, E. (1980) *J.Biol.Chem.* **255**, 3242-3244
23. Papaefthymiou, V., Girerd, J. J., Moura, I., Moura, J. J. G., and Münk, E. (1987) *J.Am.Chem.Soc.* **109**, 4703-4710
24. Johnson, M. K., Hare, J. W., Spiro, T. G., Moura, J. J. G., Xavier, A. V., and LeGall, J. (1981) *J.Biol.Chem.* **256**, 9806
25. Thomson, A. J., Robinson, A. E., Johnson, M. K., Moura, I., Moura, J. J. G., Xavier, A. V., and LeGall, J. (1981) *Biochim.Biophys.Acta* **670**, 93
26. Antonio, M. R., Averill, B. A., Moura, I., Moura, J. J. G., Orme-Johnson, W. H., Teo, B. K., and Xavier, A. V. (1982) *J.Biol.Chem.* **257**, 6646
27. Day, E. P., Peterson, J., Bonvoisin, J. J., Moura, I., and Moura, J. J. G. (1988) *J.Biol.Chem.* **263**, 3684
28. Moreno, C., Macedo, A. L., Moura, I., LeGall, J., and Moura, J. J. G. (1994) *J.Inorg.Biochem.* **53**, 219-234
29. Macedo, A. L., Palma, N., Moura, I., LeGall, J., Wray, V., and Moura, J. J. G. (1993) *Magn. Res. Chem.* **31**, S59-S67
30. Macedo, A. L., Moura, I., Surerus, K. K., Papaefthymiou, V., Liu, M., LeGall, J., Münck, E., and Moura, J. J. G. (1994) *J.Biol.Chem.* **269**(11), 8052-8058
31. Goodfellow, B. J., Macedo, A. L., Rodrigues, P., Wray, V., Moura, I., and Moura, J. J. G. (1999) *JBIC* **4**, 421-430
32. Rodrigues, P., Macedo, A. L., Goodfellow, B., Moura, I., and Moura, J. J. G. (1999) *J. Biol. Chem.* **Submetido**
33. Kissinger, C. R., Sieker, L. C., Adman, E. T., and Jensen, J. H. (1991) *J.Mol.Biol.* **219**, 693-715
34. Armstrong, F. A., Butt, J. N., George, S. J., Hatchikian, E. C., and Thomson, A. J. (1989) *FEBS lett.* **259**, 15
35. Armstrong, F. A. (1992) *Adv.Inorg.Chem.* **38**, 117

36. Smith, E. T., Blamey, J. M., Zhou, Z. H., and Adams, M. W. W. (1995) *Biochemistry* **53**, 219-234
37. Tong, J., and Feinberg, B. A. (1994) *J.Biol.Chem.* **269**, 24920-24927
38. Kawasaki, T., Wakagi, T., Isogai, Y., Tanaka, K., Likuza, T., and Oshima, T. (1994) *J.Biol.Chem.* **269**, 29444-29450
39. Duff, J. L. C., Breton, J. L. J., Butt, J. N., Armstrong, F. A., and Thomson, A. J. (1996) *J.Am.Chem.Soc.* **118**, 8593-8603
40. Münk, E., Papaefthymiou, V., Surerus, K. K., and Girerd, J. J. (1988) in *Metal Clusters in Proteins* (Que, L., Jr., ed) Vol. 372, pp. cap.15, ACS Symposium Series, Washington, DC
41. Kent, T. A., Huynh, B. H., and Münck, E. (1980) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **77**, 6574
42. Moura, J. J. G., Macedo, A. L., and Palma, P. N. (1994) in *Inorganic Microbial Sulfur Metabolism* (Peck, H. D., Jr.; LeGall, J., ed) Vol. 243, pp. 165-188, Academic Press, Inc., San Diego, CA.
43. Watt, G., and Reddy, K. (1994) *J.Inorg.Biochem.* **53**, 281-294
44. Angove, H., Yoo, S., Burgess, B., and Münck, E. (1997) *J.Am.Chem.Soc.* **119**, 8730-8731
45. Bertini, I., Ciurli, S., and Luchinat, C. (1995) *Structure and Bonding* **83**, 1
46. Middleton, P., Dickson, D. P. E., Johnson, C. E., and Rush, J. D. (1978) *Eur.J.Biochem.* **88**, 135-141
47. Bertini, I., Briganti, F., Luchinat, C., Messori, L., Monnanni, R., Scozzafava, A., and Vallini, G. (1992) *Eur.J.Biochem.* **204**, 831-839
48. Conover, R. C., Kowai, A. T., Fu, W., Park, J. B., Aono, S., Adams, M. W. W., and Johnson, M. K. (1990) *J.Biol.Chem.* **265**, 8533-8541
49. Middleton, P., Dickson, D. P. E., Johnson, C. E., and Rush, J. D. (1980) *Eur.J.Biochem.* **104**, 289-296
50. Noodleman, L. (1988) *Inorg.Chem.* **27**, 3677-3679
51. Banci, L., Bertini, I., and Luchinat, C. (1991), pp. cap.7, VCH, Weinheim
52. Johnson, M. K., Bennet, D. E., Fee, J. A., and Sweeney, W. V. (1987) *Biochem.Biophys.Acta* **911**, 81-94
53. Bertini, I., Dikii, A., Luchinat, C., Macinai, R., Viezolli, M. S., and Vincenzini, M. (1997) *Biochemistry* **36**, 3570-3579
54. Macedo, A. L., Besson, S., Moreno, C., Fauque, G., Moura, J. J. G., and Moura, I. (1996) *Biochem.Biophys.Res.Com.* **229**, 524-530

55. Sweeney, W. V. (1981) *J.Biol.Chem.* **256**, 12222-12227
56. Chong, H., Grohmann, K., and Sweeney, W. V. (1990) *J.Biol.Chem.* **265**, 12388-12292
57. Imai, T., Matsumoto, T., Ohta, S., Ohmori, D., Suzuki, K., Tanaka, J., Tsukioka, M., and Tobari, J. (1983) *Biochim.Biophys.Acta* **743**, 91-97
58. Trower, M. K., Emptage, M. H., and Sariaslani, F. S. (1990) *Biochem.Biophys.Acta* **1037**, 281-289
59. Matsubara, H., and Saeki, K. (1992) *Adv.Inorg.Chem.* **38**, 223-280
60. Hase, T., Wakabayashi, S., Matsubara, H., Ohmori, D., and Suzuki, K. (1978) *FEBS lett.* **91**, 315-319
61. Saeki, K., Wakabayashi, S., Zumft, W. G., and Matsubara, H. (1988) *J.Biochem.* **104**, 242-246
62. Sato, S., Nakazawa, K., Hon-nami, K., and Oshima, T. (1981) *Biochem.Biophys.Acta* **668**, 277-289
63. Trower, M. K., Marshall, J. E., Doleman, M. S., Emptage, M. H., and Sariaslani, F. S. (1990) *Biochem.Biophys.Acta* **1037**, 290-296
64. Aono, S., Bertini, I., Cowan, J. A., Luchinat, C., Rosato, A., and Viezoli, M. S. (1996) *JBIC* **1**, 523-528
65. Shetna, Y. I. (1970) *Biochem.Biophys.Acta* **205**, 58-62
66. Yoch, D. C., and Arnon, D. I. (1972) *J.Biol.Chem.* **247**, 4514-4520
67. Bovier-Lapierre, G., Bruschi, M., Bonicel, J., and Hatchikian, E. C. (1987) *Biochem.Biophys.Acta* **913**, 20-26
68. George, S. J., Armstrong, F. A., Hatchikian, E. C., and Thomson, A. J. (1989) *Biochem.J.* **264**, 275-284
69. Carter, C. W. J. (1977) (W.Lovenberg, ed) Vol. 3, pp. 157, Academic Press, New York
70. Eck, E. D., and Dayhoff, M. O. (1966) *Science* **152**, 363-366
71. Adman, E. T., Sieker, L. C., and Jensen, L. H. (1973) *J.Biol.Chem.* **248**, 3987-3996
72. Adman, E. T., Sieker, L. C., and Jensen, L. H. (1976) *J.Biol.Chem.* **251**, 3801
73. Backes, G., Mino, Y., Lochr, T. M., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., Sweeney, W. V., Adman, E. T., and Lochr, S. (1991) *J.Am.Chem.Soc.* **113**, 2055
74. Duèe, E. D., Fanchon, E., Vicat, J., Sieker, L. C., Meter, J., and Moulis, J. M. (1994) *J.Mol.Biol.* **243**, 683
75. Otaka, E., and Ooi, T. (1987) *J.Mol.Evol.* **26**, 257-267

76. Saeki, K., Suetsugu, Y., Tokuda, K., Miyatake, Y., Young, D., Marrs, B. L., and Matsubara, T. (1991) *J.Biol.Chem.* **266**, 12889-12895
77. Schmehl, M., Jahn, A., Meyer, A., Hennecke, S., Masepohl, B., Schuppler, M., Marxer, M., Oelze, J., and Klipp, W. (1993) *Mol.Gen.Genet.* **241**, 602-615
78. Bertini, I., Donaire, A., Feinberg, B. A., Luchinat, C., Piccioli, M., and Yuan, H. (1995) *Eur.J.Biochem.* **232**, 192-205
79. Gaillard, J., Moulis, J. M., and Meyer, J. (1987) *Inorg.Chem.* **26**, 320-324
80. Bertini, I., Capozzi, F., Luchinat, C., Piccioli, M., and Vila, A. J. (1994) *J.Am.Chem.Soc.* **116**, 651-660
81. Huber, J. G., Gaillard, J., and Moulis, J.-M. (1995) *Biochemistry* **34**, 194-205
82. Rodrigues, P., Graça, F., Macedo, A. L., Moura, I., Moura, J. J. G., and Rusnak, F. (1999) *in production*
83. Beck, J. L., de Jersey, J., Zerner, B., Hendrich, M. P., and Debrunner, P. G. (1988) *J.Am.Chem.Soc.* **110**, 3317
84. Johnson, W. H. (1979) *Biochim.Biophys.Acta* **576**, 192
85. Lindhal, P. A., Ragsdale, S. W., and Münck, E. (1990) *J.Biol.Chem.* **265**, 3880
86. Moura, I., Moura, J. J. G., Münck, E., Papaefthymiou, V., and LeGall, J. (1986) *J.Am.Chem.Soc.* **108**, 349
87. Surerus, K. K., Münck, E., Moura, I., Moura, J. J. G., and LeGall, J. (1987) *J.Am.Chem.Soc.* **109**, 3805
88. Surerus, K. K. (1989), PhD Thesis Universidade de Minnesota, USA
89. Moura, J. J. G. (1987) *Rev.Port.Quím.* **29**, 103-109
90. Conover, R. C., Kowai, A. T., Fu, W., Park, J. B., Aono, S., Adams, M. W. W., and Johnson, M. K. (1990) *J.Biol.Chem.* **265**, 8563
91. Fu, W., Telser, J., Hoffman, B. M., Smith, E. T., Adams, M. W. W., Finnegan, M. G., Conover, R. C., and Johnson, M. K. (1994) *J.Am.Chem.Soc.* **116**, 5722-5729
92. Butt, J. N., Armstrong, F. A., Breton, J., George, S. J., Thomson, A. J., and Hatchikian, E. C. (1991) *J.Am.Chem.Soc.* **113**, 6663-6670
93. Butt, J. N., Sucheta, A., Breton, J., Thomson, A. J., and Hatchikian, E. C. (1991) *J.Am.Chem.Soc.* **113**, 8948-8950
94. Butt, J. N., Niles, J., Armstrong, F. A., Breton, J., and Thomson, A. J. (1994) *Structural Biology* **1**(7), 427-433
95. Beinert, H., Holm, R., and Münck, E. (1997) *Science* **277**, 653-659

96. Bominaar, E., Achim, C., Borshch, S., Girerd, J.-J., and Münck, E. (1997) *Inorg.Chem.* **36**, 3689-3701
97. Lamotte, B., and Mouesca, J.-M. (1997) *C.R.Acad.Sci.* **324**, 117-132
98. Johnson, M., Duin, E., Crouse, B., Golinelli, M.-P., and Meyer, J. (1998) in *Spectroscopic Methods in Bioinorganic Chemistry* (Solomon, E., and Hodgson, K., eds), American Chemical Society, Washington D.C.
99. Zener, C. (1951) *Phys.Rev.* **82**, 403
100. Anderson, P., and Hasegawa, H. (1955) *ibid.* **100**, 675
101. Gütlich, P., Link, R., and Trautwein, A. (1978) *Mössbauer spectroscopy and transition metal chemistry* (Verlag, S., Ed.), Berlin
102. Noodleman, L., Peng, C. Y., Case, D. A., and Mouesca, J.-M. (1995) *Coord.Chem.Rev.* **144**, 199
103. Noodleman, L., and Baerends, J. (1984) *J.Am.Chem.Soc.* **106**, 2316
104. Girerd, J.-J. (1983) *J.Chem.Phys.* **79**, 1766
105. Bominaar, E. L., Hu, Z., Münck, E., Girerd, J.-J., and Borshch, S. A. (1995) *J.Am.Chem.Soc.* **117**, 6976
106. Borshch, S. A., Bominaar, E. L., Blondin, G., and Girerd, J.-J. (1993) *ibid.* **115**, 5155
107. Crouse, B. R., Meyer, J., and Johnson, M. K. (1995) *ibid* **117**, 9612
108. Achim, C., Golinelli, M. P., Bominaar, E. L., Meyer, J., and Münck, E. (1996) *ibid* **118**, 8168
109. Jordanov, J., Roth, E. K. H., Fries, P. H., and Noodleman, L. (1990) *Inorg.Chem.* **29**, 4288
110. Mouesca, J. M., Rius, G., and Lamotte, B. (1993) *J.Am.Chem.Soc.* **115**, 4714-4731
111. Gloux, J., Gloux, P., Lamotte, B., Mouesca, J.-M., and Rius, G. (1994) *ibid* **116**, 1953
112. Belinskiy, M., Bertini, I., Galas, O., and Luchinat, C. (1996) *Inorg.Chim.Acta* **243**, 91
113. Johnson, M. (1998) *Curr.Opin.Chem.Biol.* **2**, 173-181
114. Gamelin, D. A., Bominaar, E. L., Kirk, M. L., Wieghardt, E. I., and Solomon, E. L. (1996) *J.Am.Chem.Soc.* **118**, 8085
115. Banci, L., and all, e. (1993) *Biochemistry* **32**, 9387
116. Babini, E., Bertini, I., Borsari, M., Capozzi, F., Dikiy, A., Eltis, L. D., and Luchinat, C. (1996) *J.Am.Chem.Soc.* **118**, 75-80
117. Calzolari, L., Gorst, C. M., Bren, K. L., Zhou, Z. H., Adams, M. W. W., and LaMar, G. N. (1997) *J.Am.Chem.Soc.* **119**, 9341-9350

118. Arendsen, A. F., Hadden, J., Card, G., McAlpine, A. S., Bailey, S., Zaitsev, V., Duke, E. H. M., Lindley, P. F., Kröckel, M., Trautwein, A. X., (1998) *J.Biol.Inorg.Chem.* **3**, 81-95
119. de Voch, M. L., Kooter, I. M., Bulsink, Y. B. M., Hagen, W. R., and Johnson, M. K. (1996) *J.Am.Chem.Soc.* **118**, 2766-2767
120. Moura, I., Tavares, P., Moura, J. J. G., Ravi, N., Huynh, B. H., Liu, M.-Y., and LeGall, J. (1992) *J.Biol.Chem.* **267**, 4489-4496
121. Tavares, P., Pereira, A. S., Krebs, C., Ravi, N., Moura, J. J. G., Moura, I., and Huynh, B. H. (1998) *Biochemistry* **37**, 2830-2842
122. Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1995) *Nature* **373**, 580-587
123. Volbeda, A., Garcin, E., Piras, C., Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1996) *J.Am.Chem.Soc.* **118**, 12989-12996
124. Happe, R. P., and Bagley, K. A. (1997) *Nature* **385**, 126
125. Fontecilla-Camps, J. C. (1996) *J.Biol.Inorg.Chem.* **1**, 91
126. Higuchi, Y., Yagi, T., and Yasuoka, N. (1997) *Structure* **5**, 1671-1680
127. Adams, M. W. (1990) *Biochim.Biophys.Acta* **1020**, 115-145
128. Peters, J. W., Lanzilotta, W. N., Lemon, B. J., and Seefeldt, L. C. (1998) *Science* **282**, 1853-1858
129. Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C. E., and Fontecilla-Camps, J. C. (1999) *Structure* **7**, 13-23
130. Peters, J. W., Stowell, M. H. B., Soltis, S. M., Finnegan, M. G., Johnson, M. K., and Rees, D. C. (1997) *Biochemistry* **36**, 1181-1187
131. Shindelin, H., Kisker, C., Schlessman, J. L., Howard, J. B., and Rees, D. C. (1997) *Nature* **387**, 370-376
132. Beinert, H., Kennedy, M. C., and Stout, C. D. (1996) *Chem.Rev.* **96**, 2335
133. Flint, D. H., and Allen, R. M. *ibid.* , 2315
134. Rouault, T. A., and Klausner, R. D. (1996) *J.Biol.Inorg.Chem.* **1**, 494-499
135. Künkel, A., Vaupel, M., Heim, S., Thauer, R. K., and Hedderich, R. (1997) *Eur.J.Biochem.* **244**, 226-234
136. Duin, E. C., Lafferty, M. E., Crouse, B. R., Allen, R. M., SAnyal, I., Flint, D. H., and Johnson, M. K. (1997) *Biochemistry* **36**, 11811-11820
137. Broderick, J. B., Duderstadt, R. E., Fernandez, D. C., Wojtuszewski, K., Henshaw, T. F., and Johnson, M. K. (1997) *J.Am.Chem.Soc.* **119**, 7396-7397



138. Frey, P. A., and Reed, G. H. (1993) *Adv.Enzymol.Relat.Areas Mol.Biol.* **66**, 1-39
139. Rouault, T. A., and al., e. (1992) *Biometals* **5**, 131
140. Hentze, W., and Kühn, L. C. (1996) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **93**, 8175
141. Beinert, H., and Kiley, P. (1996) *FEBS Lett.* **382**, 218
142. Gaudu, P., and Weiss, B. (1996) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **93**, 10094
143. Hidalgo, E., Bollinger, J. M. J., Bradley, T. M., Walsh, C. T., and Demple, B. (1995) *J.Biol.Chem.* **270**, 20908
144. Khoroshilova, N., Beinert, H., and Kiley, P. J. (1995) *ibid.* **92**, 2499
145. Lazazzera, B. A., Beinert, H., Khoroshilova, N., Kennedy, M. C., and Kiley, P. J. (1996) *J.Biol.Chem.* **271**, 2762
146. Khoroshilova, N., Popescu, C., Münk, E., Beinert, H., and Kiley, P. J. (1997) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **94**, 6087
147. Howard, J. B., and Rees, D. C. (1996) *Chem.Rev.* **96**, 2965
148. Golbeck, J. H., and Bryant, D. A. (1991) *Curr.Top.Bioenerg.* **16**, 83
149. Grandoni, J. A., Switzer, R. L., Makaroff, C. A., and Zalkin, H. (1989) *J.Biol.Chem.* **264**, 6058
150. Dailey, H. A., Finnegan, M. G., and Johnson, M. K. (1994) *Biochemistry* **33**, 403
151. Sellers, V. M., Johnson, M. K., and Dailey, H. A. (1996) *ibid.* **35**, 2699
152. Michaels, M. L., Pham, L., Nghiem, Y., Cruz, C., and Miller, J. H. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 3841
153. Thauer, R. K., and Schönheit, P. (1982) (Spiro, T. G., ed), pp. 329-341, Wiley-Interscience, New York
154. Philips, W. D. (1973) in *NMR of Paramagnetic Molecules* (Holm, R. H., ed), pp. 421-478, Academic, New York
155. Philips, W. D., and Poe, M. (1972) in *Methods of Enzimology* Vol. 24, pp. 304-317
156. Philips, W. D., and M., P. (1973) in *Iron-Sulfur Proteins* (Lowenberg, W., ed) Vol. 2, pp. 255-284, Academic, New York
157. Busse, S. C., La Mar, G. N., and Howard, J. B. (1991) *J.Biol.Chem.* **266**, 23714-23723
158. Clore, G. M., and Gronenborn, A. (1991) *Prog.Nucl.Magn.Reson.Spectrosc.* **23**, 43-92
159. Edison, A. S., Abildgaard, F., Westler, W. M., Moobery, E. S., and Markley, J. L. (1994) in *Methods of Enzymol.* Vol. 239, pp. 3-79
160. Wüthrich, K. (1986) in *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley Interscience, New York
161. Cheng, H., Grohmann, K., and Sweeney, W. (1992) *J.Biol.Chem.* **267**, 8073-8080

162. Banci, L., and Pierattelli, R. (1994) in *Nuclear Magnetic Resonance of Paramagnetic Macromolecules* (La Mar, G. N., ed), pp. 281, Kluwer Academic
163. Bertini, I., and Luchinat, C. (1986) *NMR of Paramagnetic Molecules in Biological Systems*, Benjamin/Cummings
164. Bertini, I., Turano, P., and Vila, A. J. (1993) *Chem.Rev.* **93**, 2833
165. Bertini, I., Luchinat, C., and Rosato, A. (1996) *Prog.Biophys.Molec.Biol.* **66**, 43
166. Bertini, I., and Luchinat, C. (1996) *NMR of Paramagnetic substances*. *Coord.Chem.Rev.* (Lever, A. B. P., Ed.), 150, Elsevier
167. Goodfellow, B. J., and Macedo, A. L. (1999) *Annual Rep. NMR spec.*, in press
168. Banci, L., Bertini, I., and Luchinat, C. (1990) *Struct.Bond.* **72**, 113-136
169. La Mar, G. N., and Walker, F. A. (1973) *J.Am.Chem.Soc.* **95**, 6950
170. Bertini, I., Capozzi, F., Luchinat, C., and Xia, Z. (1993) *J.Phys.Chem.* **97**, 1134
171. Bertini, I., Galas, O., Luchinat, C., Messori, L., and Parigi, G. (1995) *J.Phys.Chem.* **99**, 14217
172. Yu, L. P., La Mar, G. N., and Rajarathnam, K. (1990) *J.Am.Chem.Soc.* **112**, 9527
173. Banci, L., Bertini, I., Marconi, S., Pierattelli, R., and Sligar, S. G. (1994) *J.Am.Chem.Soc.* **116**, 4866
174. Werth, M. T., Kurtz Jr, D. M., Moura, I., and LeGall, J. (1987) *J.Am.Chem.Soc.* **109**, 273
175. Noggle, J. H., and Schirmer, R. E. (1971) *The Nuclear Overhauser Effect*, Academic Press, New York
176. Neuhaus, D., and Williamson, M. P. (1989) *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH, New York
177. Unger, S. W., LeComte, J. T. J., and La Mar, G. N. (1985) *J.Magn.Reson.* **64**, 521

## **Capítulo II**

### **O estado nativo da ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas***

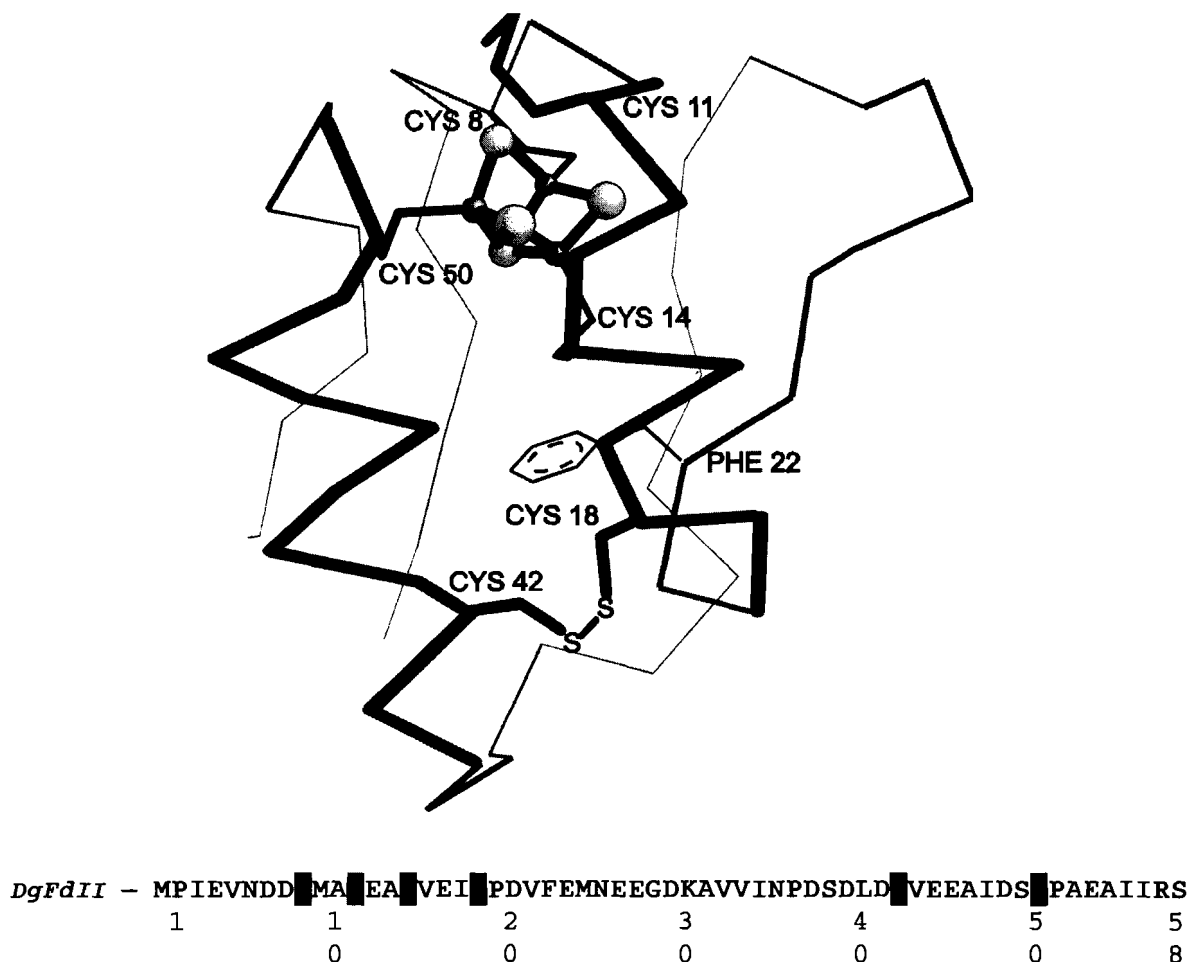
## **O estado nativo da ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas***

II.1. Breve caracterização	63
II.2. Ressonância Magnética Nuclear. Atribuição específica das ressonâncias dos prótons do agregado $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$	65
II.3. A estrutura em solução da $\text{DgFdII}_{\text{ox}}$	67
II.4. O acoplamento entre os átomos de ferro no centro $[3\text{Fe-4S}]$	71
II.4.1. Noções teóricas	71
II.4.2. O valor de J	75
II.5. Bibliografia	77

## II.1. Breve caracterização

A *Desulfovibrio gigas* (Dg) é uma bactéria redutora de sulfato (SRB), a partir da qual a ferredoxina II é purificada [1].

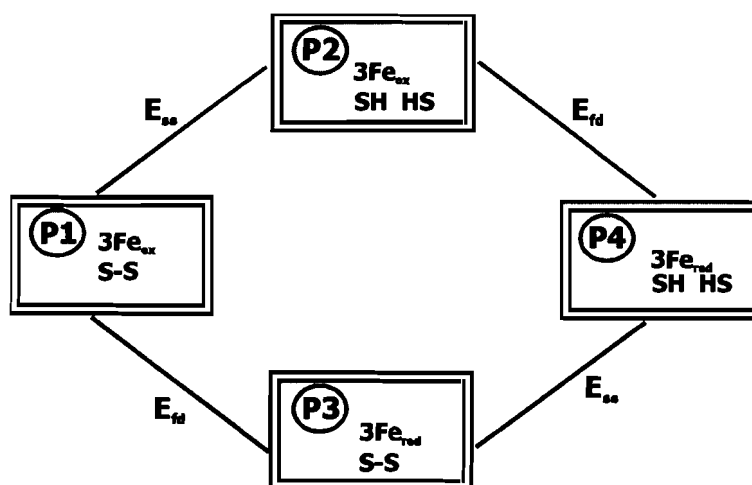
A ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas* (DgFdII) no seu estado nativo é uma proteína tetramérica de 58 resíduos de amino ácidos [2], com uma massa molecular de 6 kDa por unidade monomérica, possuindo um agregado de [3Fe-4S] por monómero, com uma isoleucina na posição 56 [3], em vez de uma valina, como previamente proposto pela estrutura de raios-X.



**Figura II.1.** Características estruturais da DgFdII, baseadas nas coordenadas de raios-X [2,4] Figura gentilmente cedida pelo Dr. Nuno Palma (em cima), e respectiva sequência de amino ácidos [3] (em baixo).

Após um ciclo de redução-oxidação esta proteína é convertida num dímero [5]. A cadeia polipeptídica contém seis resíduos cisteicos e apenas um resíduo aromático, uma fenilalanina, na posição 22. O agregado de [3Fe-4S] que se encontra coordenado à cadeia polipeptídica através de três resíduos cisteicos: Cys 8, Cys 14 e Cys 50, pode apresentar estados de oxidação +1 e 0, previamente caracterizados na secção I.2.2., denominados estado oxidado (FdII<sub>ox</sub>) e reduzido (FdII<sub>red</sub>), identificados no modelo redox sugerido por Macedo e colaboradores [6], o qual é apresentado na Figura II.2. O resíduo Cys 11, podendo coordenar um possível átomo de ferro, é o responsável pela facilidade das interconversões entre as espécies de 3Fe e 4Fe.

A análise estrutural de raios-X [2], e mais tarde estudos de RMN [6], indicam a presença de uma ponte dissulfureto entre as cisteínas 18 e 42 (ver Figura II.1.), a qual é quebrada durante o processo de redução do agregado [3Fe-4S], a cerca de -130mV, dando origem ao estado FdII<sub>int</sub>, o qual é caracterizado espectroscopicamente no capítulo IV.



S-S – Ponte dissulfureto formada    SH HS - Ponte dissulfureto reduzida

E<sub>SS</sub> - Potencial de oxidação-redução da ponte dissulfureto    E<sub>Fe</sub> - Potencial de oxidação-redução do centro 3Fe

P1- Estado oxidado (FdII<sub>ox</sub>)

P2 - Estado intermediário (FdII<sub>int</sub>)

P3 - Estado reduzido com ponte dissulfureto fechada

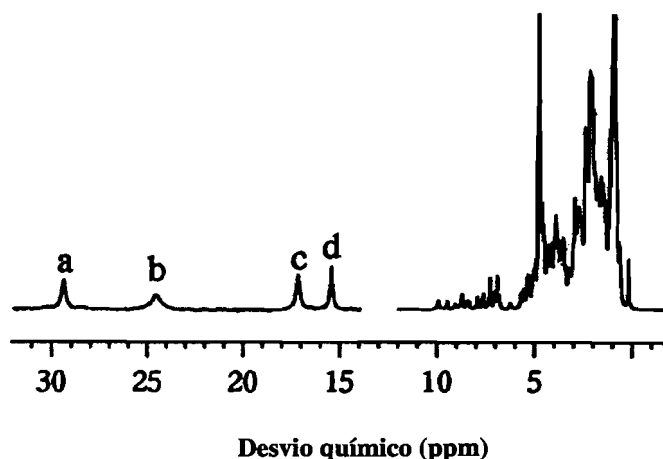
P4 - Estado reduzido com ponte dissulfureto aberta (FdII<sub>red</sub>)

**Figura II.2.** Modelo redox para a DgFdII.

Este processo redutivo permite à proteína transferir dois electrões adicionais e afecta, estruturalmente e magneticamente, as propriedades do agregado metálico [6]. O estado de oxidação  $-2$  pode ainda ser conseguido (por técnicas de electroquímica em filme), obtendo-se os três átomos de ferro no estado de oxidação  $+2$  [7-9]. Potencialmente, verifica-se assim a possibilidade desta proteína transferir um total de 5 electrões.

## II.2. Ressonância Magnética Nuclear ( RMN ). Atribuição específica das ressonâncias dos prótons do agregado $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$ [10,11]

A  $Dg\text{FdII}_{\text{ox}}$  contém na sua forma nativa um agregado  $[3\text{Fe-4S}]$  num estado de oxidação  $+1$  ( $S=1/2$ ), com um espectro de RMN de protão apresentando 4 ressonâncias largas (a-d) na região paramagnética a campo baixo entre 15 e 30 ppm [10,11] (Figura II.3).



**Figura II.3.** Espectro completo de RMN de protão a 600MHz da FdII de *D.gigas* no estado oxidado (nativo). A amostra encontra-se dissolvida em  $^2\text{H}_2\text{O}$  (100mM tampão fosfatos pH 8.0) a uma concentração de 2mM, sendo o espectro adquirido à temperatura de 300K com supressão do pico da água. As ressonâncias a campo baixo (zona paramagnética dos espectro) foram marcadas de a-d.

Estas ressonâncias pertencentes aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> dos resíduos cisteicos que coordenam o centro de 3Fe, devido ao carácter paramagnético do centro, apresentam algumas características importantes, tais como, tempos de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) rápidos da ordem dos 5ms, grandes larguras de linha e desvios químicos fora da região diamagnética do espectro. De modo a atribuir especificamente estas ressonâncias, foram realizadas experiências de NOE 1D para detectar sinais com relaxações rápidas, e NOESY 2D (com tempos de mistura curtos, da ordem dos valores de  $T_1$  das ressonâncias envolvidas [10,11]). Foram detectadas correlações no espectro NOESY 2D entre as ressonâncias **a** e **b**, **d** e ressonâncias a 9.7 e 8.6 ppm e, **c** e ressonâncias a 3.0 e 1.43 ppm. A largura de linha mais pequena, o valor mais longo de  $T_1$  e a intensidade relativa no mapa NOESY da ressonância a 9.7 ppm, comparativamente à ressonância a 8.6 ppm aponta-a como originária de um próton  $\alpha$ -CH. A atribuição dos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> da cisteína 14 às ressonâncias a 15.3 e 8.6 ppm, foram realizadas através de experiências NOE 1D e NOESY 2D, tendo sido detectadas correlações entre estas ressonâncias e as ressonâncias aromáticas da fenilalanina 22. A partir das coordenadas de raios-X [2] das cisteínas coordenantes verifica-se que somente os prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> da cisteína 14 se encontram a menos de 5 Å dos prótons aromáticos da fenilalanina 22.

A dependência do desvio químico com a temperatura indica que excepto para as ressonâncias **a** e **b**, que apresentam uma dependência do tipo *Curie*, todas as outras exibem uma dependência do tipo *anti-Curie*. Os diferentes tipos de dependência com a temperatura apresentados por estas ressonâncias são indicativos da presença a curta distância de um agregado de ferro paramagnético de spin acoplado, reflectindo as orientações intrínsecas de spin dos átomos de ferro, como já foi referido na secção I.3.1. Consequentemente, as ressonâncias **a** e **b** são atribuídas aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> do mesmo resíduo cisteico. A Tabela III.1. sumariza as atribuições específicas e os parâmetros de RMN de próton das ressonâncias



correspondentes aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> e  $\alpha$ -CH dos três ligandos cisteicos que coordenam o centro [3Fe-4S].

**Tabela II.1.** Resumo dos parâmetros de RMN e atribuição específica dos prótons dos resíduos cisteicos coordenantes para o estado nativo da *DgFdII*.  $\delta$  (ppm) – Desvio químico obtido a 300K e 400MHz.  $\langle\delta_{\text{cont}}\rangle$  (ppm) – Média dos desvios químicos de contacto para os prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> dos resíduos cisteicos. O desvio químico de contacto para cada um dos prótons foi obtido por subtracção de 2.8ppm ao respectivo desvio químico. **n.d** – não determinado.

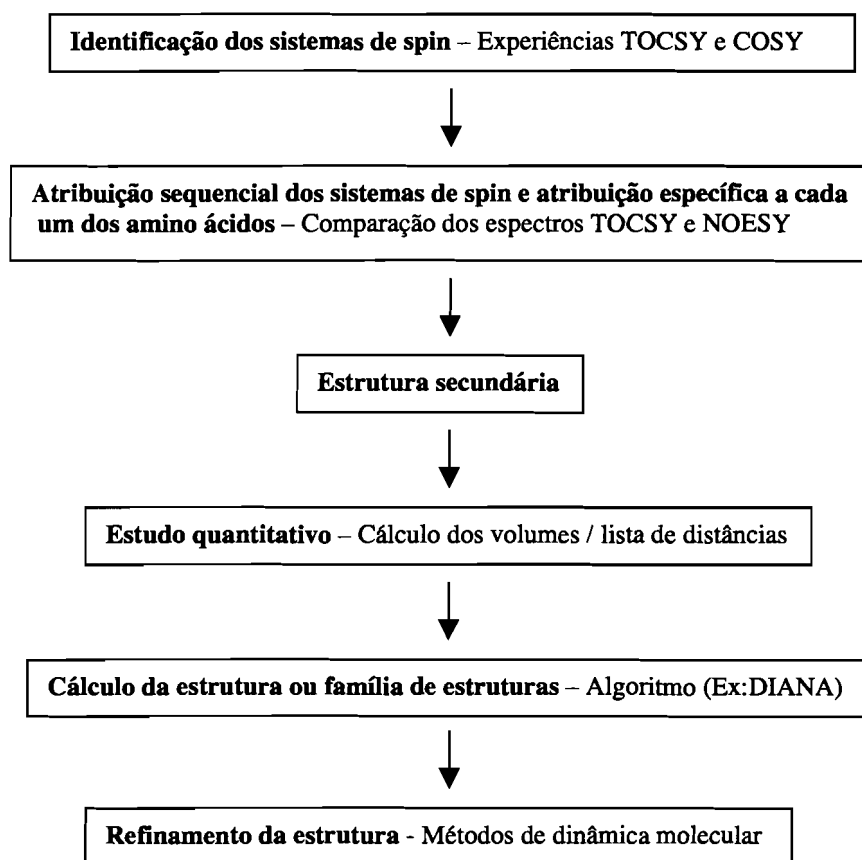
	$\delta$ (ppm)	Atribuição	$\langle\delta_{\text{cont}}\rangle$ (ppm)	T <sub>1</sub> (ms)
<b>Cys 8</b>	16.8	$\beta$ -CH <sub>2</sub>		4.0
	3.0	$\beta'$ -CH <sub>2</sub>	7.1	n.d
	1.43	$\alpha$ -CH		n.d
<b>Cys 14</b>	15.3	$\beta$ -CH <sub>2</sub>		7.0
	8.6	$\beta'$ -CH <sub>2</sub>	9.2	n.d
	9.7	$\alpha$ -CH		n.d
<b>Cys 50</b>	29.3	$\beta$ -CH <sub>2</sub>		4.3
	24.4	$\beta'$ -CH <sub>2</sub>	24.1	3.1
	4.1	$\alpha$ -CH		n.d

### II.3. A estrutura em solução da *DgFdII*<sub>ox</sub>

A estrutura de raios-X da *DgFdII* foi determinada por Kissinger e colaboradores em 1991 [2]. No entanto, adicionalmente ao facto de ser de um grande interesse comparar ambas as estruturas em solução e a de raios-X, a determinação da estrutura da *DgFdII* em solução através de espectroscopia de RMN permitirá a obtenção de informação acerca das

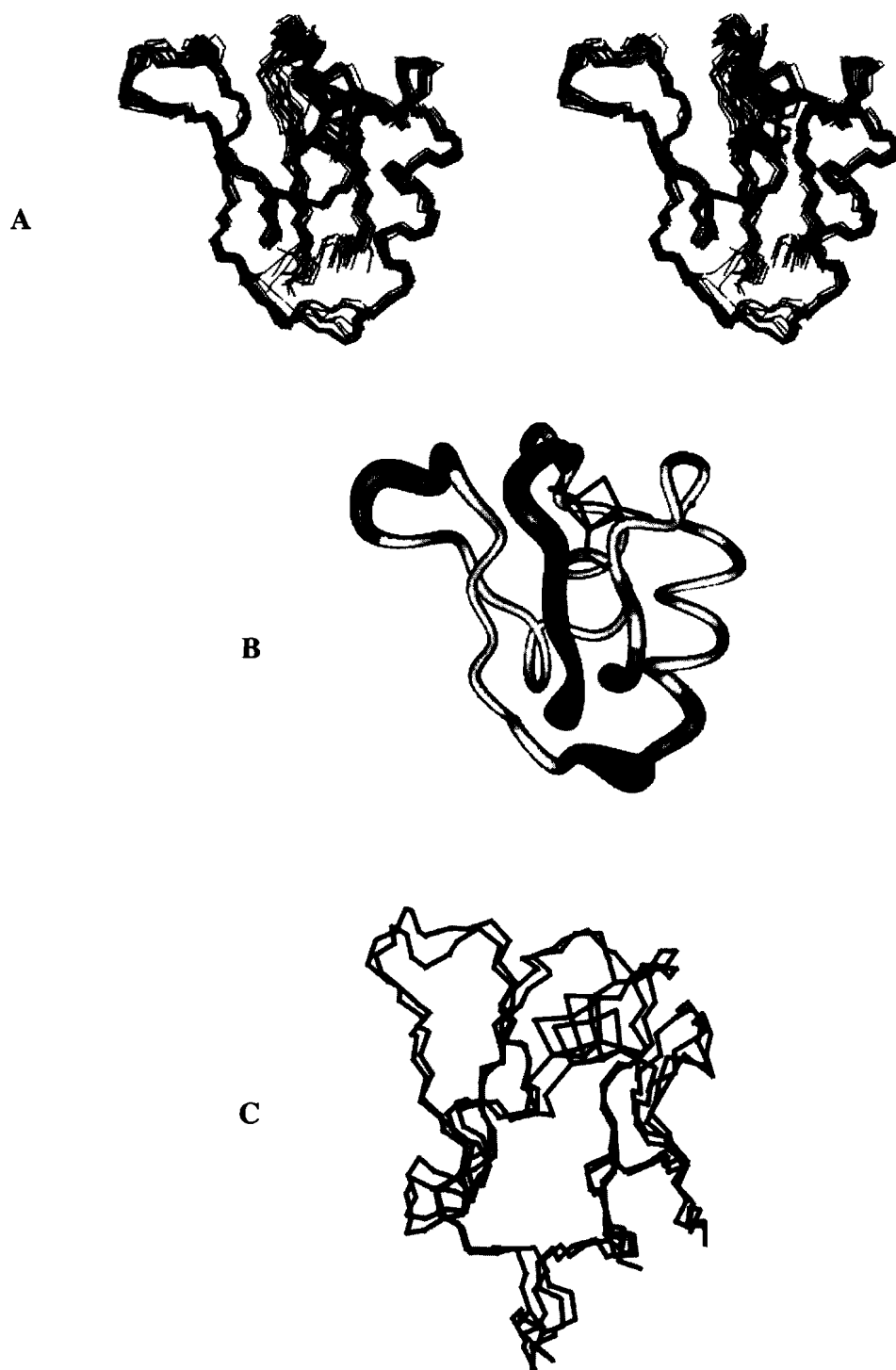
modificações estruturais que ocorrem na proteína após redução e concomitante abertura da ponte de dissulfureto presente entre as cisteínas 18 e 42, podendo eventualmente explicar o comportamento do agregado de 3Fe em termos de acoplamento entre os spins dos átomos de ferro. Assim, e tendo em conta a inexistência da estrutura de raios-X para o estado intermediário da *DgFdII*, a determinação da estrutura em solução do mesmo, actualmente a decorrer, revela-se de importância primordial. Deve-se não esquecer ainda o padrão que esta proteína representa na formação de agregados heterometálicos [7,12,13], e as características estruturais que rodeiam o ligando cisteico responsável pela coordenação do metal extra (Cys 11), as quais poderão ser largamente exploradas utilizando esta estrutura.

Os métodos de determinação de estruturas em solução por RMN são essencialmente os mesmos para proteínas diamagnéticas e paramagnéticas. A metodologia utilizada passa pela aquisição e análise dos espectros bidimensionais, através de uma atribuição específica das ressonâncias nos espectros TOCSY, seguida da detecção e quantificação de sinais nos espectros NOESY, obtendo-se distâncias inter-protónicas e outros constrangimentos estruturais. Com estes dados é possível determinar uma estrutura (ou família de estruturas), com o auxílio de um algoritmo complexo que efectua os cálculos necessários para as gerar, sendo necessário um computador com elevada capacidade de cálculo. Esta estrutura pode ser posteriormente refinada por métodos de Dinâmica Molecular. A razão de se obter uma família de estruturas, e não só uma estrutura, é explicada pelo facto de que normalmente existe mais do que uma estrutura que satisfaz a lista de condições impostas pelo cálculo das distâncias inter-protões. Assim, quanto maior for o número de condições, mais precisa é a família de estruturas obtida, o que se reflecte no parâmetro 'raiz quadrada da média do quadrado dos desvios' (em inglês "root mean square deviation", RMSD) dos protões da cadeia principal da proteína, através de valores inferiores a 1 Å. Na Figura II.4. são apresentadas as várias etapas utilizadas na determinação de uma estrutura proteica pela técnica de RMN homonuclear.



**Figura II.4.** Esquema representativo da metodologia utilizada na determinação da estrutura de uma proteína em solução pela técnica de RMN.

No caso da *DgFdII*, utilizando técnicas de RMN bidimensional (TOCSY e NOESY com tempos de mistura otimizados para a detecção de sistemas de spin diamagnéticos) em combinação com experiências de NOE 1D (realizadas para detectar sinais com tempos de relaxação curtos e correlacionar ressonâncias em ambas as regiões diamagnética e paramagnética), foi possível atribuir 51 dos 58 sistemas de spin desta proteína. A estrutura em solução por RMN foi determinada utilizando os resultados dos espectros NOE 1D e NOESY 2D, como constrangimentos de distância, em cálculos dinâmicos do ângulo de torção [14]. A informação acerca dos sistemas de spin fortemente afectados pelo paramagnetismo do



**Figura II.5.** (adaptada de [14]) **A** – Representação em estéreo das 15 estruturas da *DgFdII<sub>ox</sub>* obtidas por RMN de próton. Estas estruturas representam uma família com uma energia mínima cujo r.m.s.d. é de 0.77Å. **B** – Representação em salsicha da família, incluindo o agregado (preto). A espessura e cor são representativas dos valores de r.m.s.d. para cada resíduo relativamente a um valor médio global da estrutura (obtido no MOLMOL). A cor vermelha é indicativa de resíduos com um valor médio de r.m.s.d. >1.00Å, laranja >0.50Å e amarelo para valores <0.50Å. **C** - Sobreposição dos esqueletos representativos da estrutura da *DgFdII<sub>ox</sub>* obtida em solução (preto) e por cristalografia de raios-X (vermelho).

agregado, foi obtida a partir da estrutura de raios-X [2]. Estes cálculos originaram uma família de 15 funções estruturais representadas na Figura II.5. - A. A julgar pelo valor de r.m.s.d. de 0.77Å, a qualidade da família de RMN pode ser considerada boa, com a maior parte de ângulos phi/psi a pertencerem à denominada região permitida do diagrama de Ramachandran. A comparação com a estrutura de raios-X (Figura II.5. - B) indica que o enrolamento global da proteína é bastante similar em solução e no estado sólido. Foram no entanto observadas algumas diferenças, especialmente na região próxima ao agregado [3Fe-4S], que podem ser explicadas pela ausência de constrangimentos nesta região devido ao "branqueamento paramagnético", e também no padrão das ligações dos átomos de hidrogénio [14].

Não foram detectadas correlações no espectro NOESY 2D, que possam ser directamente atribuídas a interacções inter monómero, embora existam alguns picos cruzados não atribuídos que possam reflectir este comportamento [14]. No entanto, deve-se ter em conta que no caso do dímero ser simétrico em solução, será difícil distinguir entre si as interacções inter- e intra- monómero. Os sinais finos detectados no espectro de RMN de protão de 1D da proteína sugerem a possível presença de um dímero em solução, sendo a forma tetramérica bastante improvável. Estas observações vêm contrariar os resultados obtidos através de uma coluna Superdex-75 calibrada, que demonstram claramente a presença de um tetrâmero na forma nativa da *DgFdII* [5].

## II.4. O acoplamento entre os átomos de ferro no centro [3Fe-4S]

### II.4.1. Noções teóricas

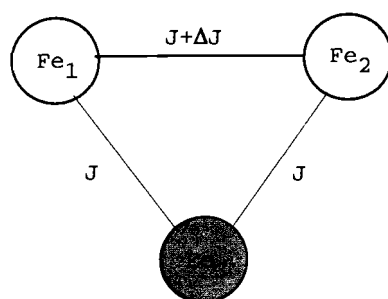
A dependência com a temperatura dos desvios químicos das ressonâncias  $\beta$ -CH<sub>2</sub>

das cisteínas 8,14 e 50 coordenantes do agregado 3Fe da DgFdII foi utilizada para estudar as propriedades electrónicas, do mesmo, no estado oxidado [10]. Foi assim desenvolvido um modelo que reflectisse o comportamento dos referidos desvios químicos com a temperatura. Para calcular o esquema dos níveis de energia do centro 3Fe e estimar os desvios químicos dos prótons dos resíduos cisteicos coordenantes foi aplicado o modelo de acoplamento de spins [15,16] e a teoria desenvolvida por Bertini e colaboradores [17], respectivamente.

Baseado nos resultados obtidos a partir de técnicas espectroscópicas de RPE e Mössbauer, demonstrou-se [16] que a estrutura electrónica do centro  $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$ , pode ser caracterizada por um sistema composto por três iões férricos de spin-alto com  $S=5/2$ , acoplados em permuta, podendo ser descrita pelo Hamiltoneano de spin de Heisenberg-Dirac-van Vleck, definido pela seguinte expressão:

$$\hat{H} = J_{12} \hat{S}_1 \cdot \hat{S}_2 + J_{13} \hat{S}_1 \cdot \hat{S}_3 + J_{23} \hat{S}_2 \cdot \hat{S}_3 \quad (1)$$

em que  $S_1=S_2=S_3=5/2$ , representam os números de spin intrínsecos dos iões férricos e  $J_{ij}$  as constantes de acoplamento de permuta entre os sítios ferro  $i$  e  $j$ . A partir dos dados de Mössbauer [16,18], deduziu-se que  $J_{12} > J_{13} \sim J_{23} > 0$ . Pode-se ainda assumir que  $J_{13} = J_{23} = J$  de forma a simplificar a análise, pelo que  $J_{12} = J + \Delta J$  ( $\Delta J > 0$ ), o que explica a dependência com a temperatura tipo *Curie* para as ressonâncias dos prótons  $\beta\text{-CH}_2$  da Cys 50, e um comportamento *anti-Curie* para os correspondentes prótons da Cys 8 e Cys 14 [10]. Este "modelo" encontra-se representado esquematicamente na Figura II.6.



**Figura II.6.** Representação esquemática do acoplamento entre os ferros no agregado 3Fe da *DgFdII<sub>ox</sub>*

Pode-se assim reescrever a equação (1) da seguinte forma,

$$\hat{H} = J \left( \hat{S}_1 \cdot \hat{S}_2 + \hat{S}_1 \cdot \hat{S}_3 + \hat{S}_2 \cdot \hat{S}_3 \right) + \Delta J \left( \hat{S}_1 \cdot \hat{S}_2 \right) \quad (2)$$

A partir desta equação podem ser obtidas soluções analíticas, sendo os valores próprios dos multipletos de spin resultantes da mesma, dados pela expressão:

$$E^n(S_{12}^n, S^n) = (J/2) [S^n(S^n + 1)] + (\Delta J/2) [S_{12}^n(S_{12}^n + 1)] \quad (3)$$

em que,  $S^n = S_1 + S_2 + S_3$  representa o spin total do centro,  $S_{12}^n = S_1 + S_2$  o spin acoplado dos sítios  $Fe_1$  e  $Fe_2$ , referindo-se o índice  $n$  ao nível do multiplete de spin. Ao centro  $[3Fe-4S]^{+1}$ , pode então ser associados os valores de  $S^0 = 1/2$  e  $S_{12}^0 = 2$ , tendo em conta os resultados obtidos por RPE e Mössbauer para o estado fundamental do mesmo [16]. Com as energias

dadas pela equação (3), os desvios químicos do ligando cisteico que coordena o sítio férrico i, podem ser calculados por [19,20]:

$$\delta = \left( \frac{2\pi g\beta}{h\gamma(3KT)} \right) x A_i \left( \frac{\sum_n C_1^n S^n (S^n + 1) (2S^n + 1) e^{(-E^n / KT)}}{\sum_n (S^n + 1) e^{(-E^n / KT)}} \right) \quad (4)$$

$A_i$  – Constante de acoplamento hiperfino isotrópico entre os prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> e os sítios férricos

$C_1^n$  - Razão das projecções de  $S_i$  e  $S^n$  ao longo da direcção do campo magnético  $\beta$ , podendo ser calculada pelo teorema de Wigner-Eckart [21,22], através das expressões (5), (6) e (7)

A constante  $A_i$  pode ser estimada através de medidas de RMN de complexos contendo um só metal, como seja o caso da rubredoxina, cujo valor é 1MHz. Este valor têm sido utilizado para explicar os resultados obtidos por RMN de próton para os centros [2Fe-2S] [23,24] e [4Fe-4S] [17,25], prevendo um desvio químico de 210 ppm para um centro monomérico, FeS<sub>4</sub>, reduzido, a 300K, que é consistente com os valores obtidos para a rubredoxina e outros compostos modelo [18]. No sistema em estudo foi assim considerado  $A_1=A_2=A_3=1\text{MHz}$  [10].

$$C_1^n = \frac{\{S^n(S^n + 1) + S_{12}^n(S_{12}^n + 1) - S_3(S_3 + 1)\}[S_{12}^n(S_{12}^n + 1) + S_1(S_1 + 1) - S_2(S_2 + 1)]}{\{2S^n(S^n + 1)\}[2S_{12}^n(S_{12}^n + 1)]} \quad (5)$$

$$C_2^n = \frac{\{S^n(S^n + 1) + S_{12}^n(S_{12}^n + 1) - S_3(S_3 + 1)\}[S_{12}^n(S_{12}^n + 1) + S_2(S_2 + 1) - S_1(S_1 + 1)]}{\{2S^n(S^n + 1)\}[2S_{12}^n(S_{12}^n + 1)]} \quad (6)$$



$$C_3^n = \frac{[S^n(S^n + 1) + S_3(S_3 + 1) - S_{12}^n(S_{12}^n + 1)]}{[2S^n(S^n + 1)]} \quad (7)$$

Tendo em conta que  $S_1=S_2=5/2$ , podemos verificar que as equações (5) e (6) são equivalentes, com  $C_1^n = C_2^n$ , tal como seria de esperar pelo modelo teórico. Por fim, aplicando as equações de (4) – (7), pode-se calcular a dependência com a temperatura das ressonâncias correspondentes a cada um dos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> pertencentes às cisteínas coordenantes, através do ajuste de somente dois parâmetros,  $J$  e  $\Delta J$ .

#### II.4.2. O valor de $J$

A observação de dependência com a temperatura do tipo *Curie* e *anti-Curie*, pressupõe, como já referido na secção anterior, um valor de  $\Delta J \neq 0$ , pois no caso de  $\Delta J = 0$  iremos ter  $J_{12}=J_{13}=J_{23}$ , com todos os sítios ferro indistinguíveis, o que faria prever dependência com a temperatura somente do tipo *anti-Curie* na gama de temperaturas de RMN (293-308 K). Sabe-se também que os declives da dependência com a temperatura são fortemente dependentes deste valor de  $\Delta J$ , sendo os desvios químicos dos prótons no espectro de RMN boas medidas de  $J$ , visto as energias dos múltiplos de spin serem determinadas por este valor, com os desvios químicos a resultarem de uma média térmica desses níveis de energia. Em face destes pressupostos, é de considerar assim um valor de  $\Delta J > 0$ , o que torna o sítio Fe<sub>3</sub> não equivalente aos sítios Fe<sub>1</sub> e Fe<sub>2</sub>, e explica o tipo de dependência com a temperatura para todos os prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> dos resíduos cisteicos coordenantes [10]. Pela análise experimental da dependência com a temperatura para estes prótons e comparação com

o cálculo desta mesma dependência, no qual se faz variar  $J$  e  $\Delta J$ , chega-se a valores de  $J \approx 300 \text{ cm}^{-1}$  e  $\Delta J/J \approx 0.02$  [10]. Esta diferença tão pequena era já esperada, uma vez que na estrutura do centro  $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$  determinada por cristalografia de raios-X [2], os três sítios férricos aparecem praticamente indistintos, diferenciados apenas pelas cisteínas que os coordenam. O valor de  $J \approx 300 \text{ cm}^{-1}$  encontra-se também, concordante com o valor mínimo de  $200 \text{ cm}^{-1}$ , obtido por medidas de susceptibilidade magnética para o centro de 3Fe no estado oxidado [26]. Neste modelo,  $\text{Fe}_3$  é atribuído ao ferro coordenado pela Cys 50, à qual correspondem os picos **a** e **b** do espectro de RMN da  $DgFdII_{ox}$  (Figura II.3.). Valores de  $J$  bastante similares a estes foram publicados para agregados  $[3\text{Fe-4S}]$  pertencentes a ferredoxinas de 7Fe, isoladas de *Bacillus schlegelli* (*Bs*) [27] e *Rhodopseudomonas palustris* (*Rp*) [28], com  $J_{12}=320$ ,  $J_{23}=280$ ,  $J_{13}=290 \text{ cm}^{-1}$  e  $J_{12}=285$ ,  $J_{13}=300$ ,  $J_{23}=320 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, com valores de  $A_{1,2,3}=1 \text{ MHz}$ . Comparando estes valores com os encontrados para a  $DgFdII_{ox}$ , pode concluir-se que a interação magnética no agregado  $[3\text{Fe-4S}]$  é menos simétrica para as ferredoxinas de 7Fe. Esta conclusão está de acordo com o facto de que nas ferredoxinas de *Bs* e *Rp*, uma ressonância "extra" pertencente ao próton  $\beta\text{-CH}$  da Cys 14, observada para a  $DgFdII_{ox}$ , não aparece na região a campo baixo do espectro de RMN de 1D das ferredoxinas de 7Fe.

## II.5. Bibliografia

1. Bruschi, M., Hatchikian, C., LeGall, J., Moura, J. J. G., and Xavier, A. V. (1976) *Biochem. Biophys. Acta* **449**, 275-284
2. Kissinger, C. R., Sieker, L. C., Adman, E. T., and Jensen, J. H. (1991) *J.Mol.Biol.* **219**, 693-715
3. Chen, B., Menon, N. K., Derventanian, L., Moura, J. J. G., and Przybyla, A. E. (1994) *FEBS Letters* **351**, 401-404
4. Kissinger, C. R., Adman, E. T., Sieker, L. C., Jensen, L. H., and LeGall, J. (1989) *FEBS letters* **244**, 447
5. Macedo, A. L., and Moura, J. J. G. resultados não publicados
6. Macedo, A. L., Moura, I., Surerus, K. K., Papaefthymiou, V., Liu, M., LeGall, J., Münck, E., and Moura, J. J. G. (1994) *J.Biol.Chem.* **269**(11), 8052-8058
7. Moreno, C., Macedo, A. L., Moura, I., LeGall, J., and Moura, J. J. G. (1994) *J.Inorg.Biochem.* **53**, 219-234
8. Armstrong, F. A., Butt, J. N., George, S. J., Hatchikian, E. C., and Thomson, A. J. (1989) *FEBS lett.* **259**, 15
9. Duff, J. L. C., Breton, J. L. J., Butt, J. N., Armstrong, F. A., and Thomson, A. J. (1996) *J.Am.Chem.Soc.* **118**, 8593-8603
10. Macedo, A. L., Moura, I., LeGall, J., Huynh, B., and Moura, J. J. G. (1993) *Inorganic Chemistry* **32**(7), 1101-1105
11. Macedo, A. L., Palma, N., Moura, I., LeGall, J., Wray, V., and Moura, J. J. G. (1993) *Magn. Res. Chem.* **31**, S59-S67
12. Moura, I., Moura, J. J. G., Münck, E., Papaefthymiou, V., and LeGall, J. (1986) *J.Am.Chem.Soc.* **108**, 349
13. Surerus, K. K., Münck, E., Moura, I., Moura, J. J. G., and LeGall, J. (1987) *J.Am.Chem.Soc.* **109**, 3805
14. Goodfellow, B. J., Macedo, A. L., Rodrigues, P., Wray, V., Moura, I., and Moura, J. J. G. (1999) *JBIC* **4**, 421-430
15. Huynh, B. H., Moura, J. J. G., Moura, I., Kent, T. A., LeGall, J., Xavier, A. V., and Münck, E. (1980) *J.Biol.Chem.* **255**, 3242-3244
16. Kent, T. A., Huynh, B. H., and Münck, E. (1980) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **77**, 6574

17. Bertini, I., Briganti, F., Luchinat, C., Scozzafava, A., and Sola, M. (1991) *J.Am.Chem.Soc.* **113**, 1237-1245
18. Werth, M. T., Kurtz Jr, D. M., Moura, I., and LeGall, J. (1987) *J.Am.Chem.Soc.* **109**, 273
19. Banci, L., Bertini, I., and Luchinat, C. (1990) *Struct.Bond.* **72**, 113-136
20. Banci, L., Bertini, I., and Briganti, F. (1991) *New J.Chem* **15**, 467-477
21. Noodleman, L. (1988) *Inorg.Chem.* **27**, 3677-3679
22. Middleton, P., Dickson, D. P. E., Johnson, C. E., and Rush, J. D. (1980) *Eur.J.Biochem.* **104**, 289-296
23. Dunham, W. R., Palmer, G., Sands, R. H., and Bearden, A. H. (1971) *Biochim.Biophys.Acta* **253**, 373-384
24. Salmeen, I., and Palmer, G. (1972) *Arch.Biochem.Biophys.* **150**, 767-773
25. Bertini, I., Briganti, F., Luchinat, C., and Scozzafava, A. (1990) *Inorg.Chem.* **29**, 1874-1880
26. Day, E. P., Peterson, J., Bonvoisin, J. J., Moura, I., and Moura, J. J. G. (1988) *J.Biol.Chem.* **263**, 3684
27. Aono, S., Bertini, I., Cowan, J. A., Luchinat, C., Rosato, A., and Viezolli, M. S. (1996) *JBIC* **1**, 523-528
28. Bertini, I., Dikiy, A., Luchinat, C., Macinai, R., Viezolli, M. S., and Vincenzini, M. (1997) *Biochemistry* **36**, 3570-3579

## **Capítulo III**

### **Caracterização do estado redox intermediário da ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas***

## **A caracterização do estado redox intermediário da ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas***

III.1. Objectivo	81
III.2. O estado intermediário da ferredoxina II de <i>D.gigas</i> ( $DgFdII_{int}$ )	81
III.3. Materiais e métodos	82
III.3.1. Purificação da $DgFdII_{nat}$	84
III.3.2. A formação do estado intermediário	84
III.4. Resultados – Caracterização da $DgFdII_{int}$	85
III.4.1. RMN de protão de 1D e dependências com a temperatura	85
III.4.2. Experiências de NOE em RMN de protão de 1D e 2D	88
III.4.3. Atribuição específica das ressonâncias dos protões do agregado $[3Fe-4S]^{+1}$ do estado intermediário	92
III.4.4. Dependência angular das ressonâncias paramagnéticas	94
III.5. Conclusões	98
III.6. Bibliografia	102

### III.1. Objectivo

Como já referido no Capítulo II (secção II.2.) a ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas* pode ser encontrada em quatro estados diferentes; estado oxidado, estado intermediário, estado reduzido e estado super-reduzido, este ultimo obtido somente por técnicas electroquímicas.

Neste capítulo foi feita a atribuição específica das ressonâncias dos três ligandos do centro de 3Fe para o estado intermediário da ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas* ( $DgFdII_{int}$ ), utilizando o mesmo tipo de metodologia (RMN de protão de 1D e 2D) previamente utilizada para a caracterização do estado oxidado da mesma proteína ( $DgFdII_{ox}$ ) [1,2]. É analisada a dependência angular das ressonâncias paramagnéticas pertencentes aos prótons dos ligandos cisteicos que coordenam o centro 3Fe.

### III.2. O estado intermediário da ferredoxina II de *D.gigas* ( $DgFdII_{int}$ )

O estado intermediário  $DgFdII_{int}$  foi pela primeira vez detectado durante uma titulação redox da  $DgFdII$ , monitorizada por RMN, sendo originado numa gama de potenciais de oxidação-redução do potencial de redução do centro  $[3Fe-4S]^{+1}$  a  $[3Fe-4S]^0$ , que apresenta um  $E_0 = -130mV$  [3]. Este estado intermediário, que se encontra em equilíbrio lento com  $FdII_{ox}$  ou  $FdII_{red}$ , foi observado tanto nos processos de redução com ditionito de sódio, hidrogénio/hidrogenase ou após reoxidação parcial do estado reduzido da  $DgFdII$  ( $DgFdII_{red}$ ) com 2,6-diclorofenolindofenol ou ar [3].

A caracterização do  $DgFdII_{int}$  por técnicas de Mössbauer e RPE, indicou que o centro  $[3Fe-4S]$ , permanece no estado oxidado +1 [4]. O espectro de RMN de protão, representado

na Figura III.1. apresenta quatro ressonâncias características, situadas no envelope paramagnético a 24, 21.5, 21 e 14 ppm, com desvios químicos diferentes das ressonâncias características do estado oxidado desta mesma proteína, tal como se pode verificar por comparação deste espectro com o da *DgFdII<sub>ox</sub>* (Figura II.3.).

As diferenças encontradas, tanto no valor de desvio químico das ressonâncias na região a campo baixo do espectro de RMN, como nos espectros de Mössbauer, entre os estados oxidado e intermediário da ferredoxina II de *D.gigas*, são atribuídas a mudanças conformacionais resultantes da quebra/formação da ponte de dissulfureto situada entre as cisteínas 18 e 42 da cadeia polipeptídica da proteína [3]. As titulações redox da *DgFdII* com metil viologénio, monitorizadas por espectroscopia de UV/Visível, demonstram um total de 3 electrões requeridos para reduzir totalmente a proteína entre os estados  $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$  e  $[3\text{Fe-4S}]^0$ . Resultados similares foram encontrados para a ferredoxina de 4Fe de *Pyrococcus furiosus* [5]. O estado intermediário P2 apresentado no modelo redox proposto para a *DgFdII* (Figura II.2) [3] é assim caracterizado pela presença do agregado  $[3\text{Fe-4S}]$  no estado de oxidação +1, e pela ponte dissulfureto aberta.

### III.3. Materiais e métodos

As amostras de FdII foram purificadas a partir de extractos celulares de *Desulfovibrio gigas* pela técnica referida na secção III.3.1. As resinas, aniónica DEAE-52, Sephadex A-50 e a coluna de filtração em gel pré-empacotada Superdex 75 HR 10/30, foram adquiridas à Pharmacia Biotech Inc. Os espectros de UV/Visível foram registados a temperatura ambiente ( $T_a$ ), utilizando um espectrofotómetro Shimadzu UV-65. A proteína em todos os passos do esquema de isolamento e purificação foi concentrada utilizando uma unidade com uma célula



agitadora equipada com uma membrana para Diaflow YM5, ou centricons com membranas de 5 kDa, tudo da Amicon. As concentrações de proteína foram calculadas com  $\epsilon_{412\text{nm}} = 15700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [6].

Os espectros de RMN de próton de alta resolução foram obtidos em espectrómetros Bruker ARX de 400MHz e AMX de 600MHz, equipados com uma unidade de controlo de temperatura. Os valores de desvio químico são definidos em partes por milhão (ppm) relativamente ao 3-trimetilsilil-(2,2,3,3- $^2\text{H}_4$ ) propionato. Os valores positivos referem-se a desvios para campo baixo. As amostras foram preparadas com proteína pura com uma concentração de 2mM e equilibrada com tampão fosfatos 100mM, pH 8.0 e permutadas com 99.9%  $^2\text{H}_2\text{O}$  ou 10%  $^2\text{H}_2\text{O}$  / 90%  $\text{H}_2\text{O}$  em centricons Amicon, com membranas de 5kDa.

As experiências de NOE foram efectuadas em ambos os espectrómetros de 400MHz e 600MHz, utilizando a sequência de pulsos super-WEFT (180- $\tau$ -90-AQ) [7] com valores de  $\tau$  e tempos de reciclagem da ordem dos 100-200ms, de forma a suprimir o pico da água. A saturação selectiva das ressonâncias foi feita durante o tempo de espera  $\tau$ . Os espectros diferença foram obtidos por subtracção dos espectros irradiados fora da ressonância, dos espectros irradiados na ressonância, como previamente descrito [8]. Os espectros "Phase Sensitive" NOESY [9,10], com diferentes tempos de mistura de 2-10ms, utilizados para detectar conectividades entre prótons com tempos de relaxação bastante curtos, foram adquiridos com 1024 pontos na direcção t2 e 256 blocos na direcção t1, com 3000-4000 scans por incremento e larguras de varrimento de 60 ppm. Os tempos de repetição variaram entre 75 e 100ms. Os espectros NOESY com um tempo de mistura de 150ms foi adquirido a 600MHz, com larguras de varrimento de 14 ppm, 1024 pontos na direcção t2, 512 incrementos na direcção t1 e 64 scans por incremento, de forma a detectar conectividades entre prótons na região diamagnética do espectro. Antes de realizar a transformada de Fourier os FID dos espectros adquiridos foram multiplicados por uma função seno em ambas as dimensões  $f_1$  e  $f_2$ .

Os valores de  $T_1$  foram calculados utilizando a sequência de inversão-recuperação [11] com vinte tempos de espera entre 10 $\mu$ s e 400ms.

Os valores das distâncias a partir do raios-X, foram observados numa Estação Gráfica Personal IRIS Indigo-Silicon Graphics com sistema operativo UNIX e software para modulação molecular SYBYL versão 5.3 - 5.5 (Tripos Associates).

### ***III.3.1. Purificação da DgFdII<sub>nat</sub>***

A DgFdII<sub>nat</sub> foi purificada tal como descrito anteriormente [6], mas com uma ligeira modificação em que foi introduzido um ultimo passo no esquema de purificação. Neste passo de purificação foi utilizada uma coluna de filtração em gel pré-empacotada Superdex 75 HR 10/30, sendo a proteína eluida com tampão fosfatos 50mM, pH 7.6 + NaCl 150mM. A DgFdII<sub>nat</sub> purificada, apresenta uma razão  $Abs_{415nm}/Abs_{305nm}=0.7$ .

### ***III.3.2. A formação do estado intermediário***

O estado intermediário é gerado directamente no tubo de RMN em que se encontra a amostra de proteína pura, preparada tal como descrito em III.3. Para isso, a proteína no seu estado nativo ou oxidado (DgFdII<sub>ox</sub>), é colocada sob atmosfera inerte (N<sub>2</sub> ou Ar), adicionando-se uma pequena quantidade de EDTA (ácido etileno diamina tetra-acético) em pó ou a partir de uma solução preparada em <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, de forma a prevenir a formação de agregados [4Fe-4S]. Seguidamente, sob uma corrente de gás inerte, é adicionado ditionito de sódio

(agente redutor) em pó ou a partir de uma solução 0.1M em  $^2\text{H}_2\text{O}$ , tamponizada com fosfatos 0.1M a pH 8.0. Os tubos são selados com cápsulas de borracha, de forma a prevenir a reoxidação da proteína durante a obtenção do espectro de RMN. É adquirido um espectro de RMN de próton de 1D, de forma a poder observar-se o estado de oxidação em que se encontra a proteína. Duas situações podem suceder; ou a amostra contém ainda algum estado oxidado, sendo neste caso necessário repetir o processo já descrito em cima, ou então a amostra apresenta já características de estado reduzido pelo que será necessário fazer uma reoxidação da proteína através da adição controlada de ar, com o auxílio de uma seringa.

Pretende-se no final, obter uma amostra de proteína com a maior percentagem possível de estado intermediário. Normalmente, obtêm-se amostras com misturas de mais do que um estados de oxidação, sendo sempre que possível indicada a percentagem de cada um deles na amostra.

Este estado intermediário obtido por redução com ditionito de sódio do estado nativo da *DgFdII* (*DgFdII<sub>ox</sub>*), é estável por vários dias em ambiente inerte, permitindo assim a aplicação de técnicas de RMN.

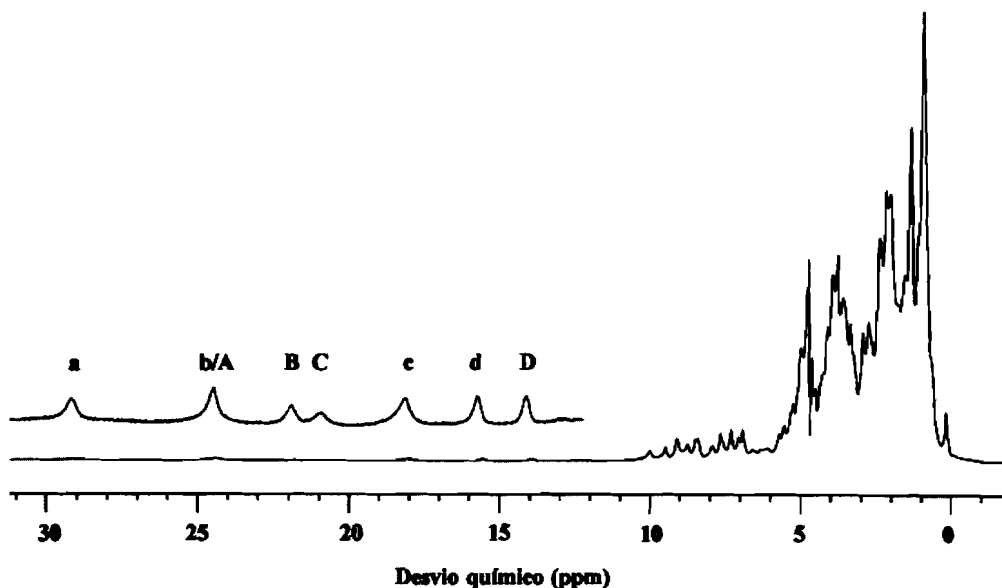
### **III.4. Resultados – Caracterização da *DgFdII<sub>int</sub>***

#### ***III.4.1. RMN de prótons de 1D e dependências com a temperatura***

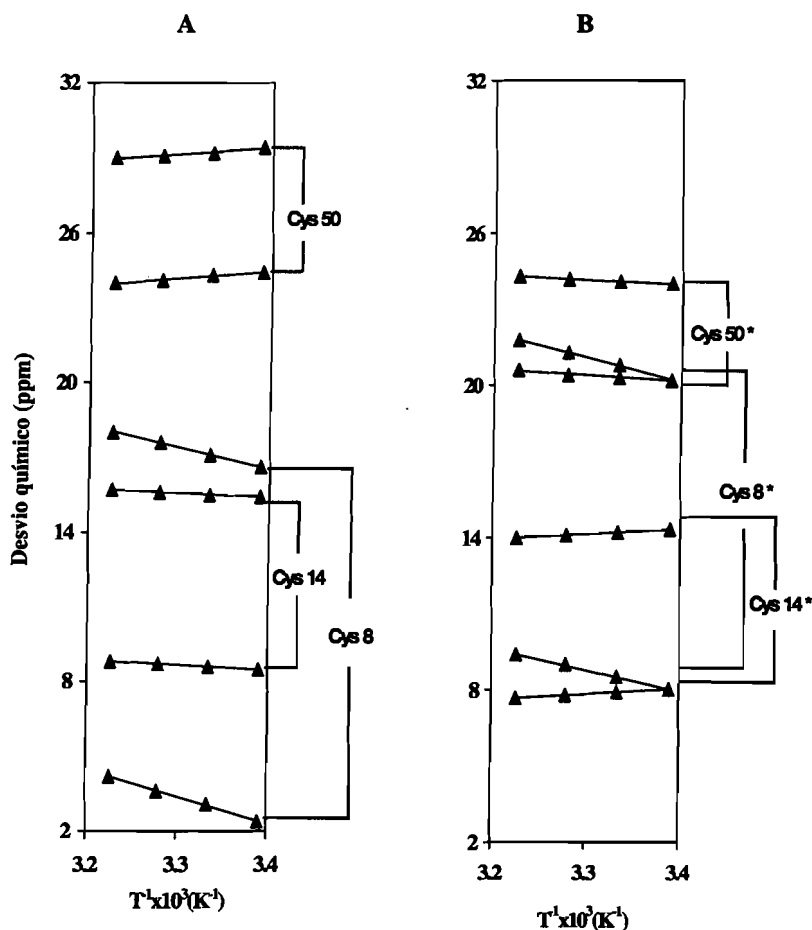
A Figura III.1. apresenta o espectro de RMN de próton de uma amostra de *DgFdII*, na qual a proteína está em equilíbrio entre os estados oxidado e intermediário. Como descrito previamente [1], a *DgFdII<sub>ox</sub>* apresenta quatro ressonâncias alargadas a 29.3, 24.4, 16.8 e 15.3 ppm, na região a campo baixo do espectro, à temperatura ambiente. Estas

ressonâncias (marcadas **a,b,c** e **d**) foram atribuídas aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> dos três ligandos cisteicos que coordenam o agregado de 3Fe [1,2]. As atribuições específicas destas ressonâncias são apresentadas na Tabela III.1.

As ressonâncias na região de 25 a 12 ppm designadas de **A-D** na Figura III.1., pertencem aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas 8, 14 e 50 que coordenam o agregado de 3Fe, no estado intermediário. A dependência com a temperatura dos desvios químicos dos três pares de prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> dos ligandos cisteicos para ambos os estados oxidado (ressonâncias **a, b, c, d**, 8.6 ppm e 3.0 ppm) e intermediário (**A, B, C, D**, 8.7 ppm e 7.8 ppm), são apresentados na Figura III.2.



**Figura III.1.** Espectro completo de RMN de próton a 400MHz (com supressão do pico da água) de uma mistura de *DgFdII<sub>ox</sub>/DgFdII<sub>int</sub>* em <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O a 310K. A região a campo baixo expandida apresenta ressonâncias, marcadas de **a-d** e **A-D**, pertencentes aos estados oxidado e intermediário da *DgFdII*, respectivamente. A mistura é composta por 54% de estado oxidado e 46% de estado intermediário. Não foi detectado estado reduzido.



**Figura III.2.** Dependência com a temperatura dos sinais a campo baixo, obtidos por RMN de próton, para a *DgFdII<sub>ox</sub>* (A) e *DgFdII<sub>int</sub>* (B) para os resíduos cisteicos 8, 14 e 50. As linhas a cheio indicam a tendência de comportamento da dependência de temperatura na gama de temperaturas representada. \* - A atribuição específica destas ressonâncias é posteriormente realizada na secção III.4.3.

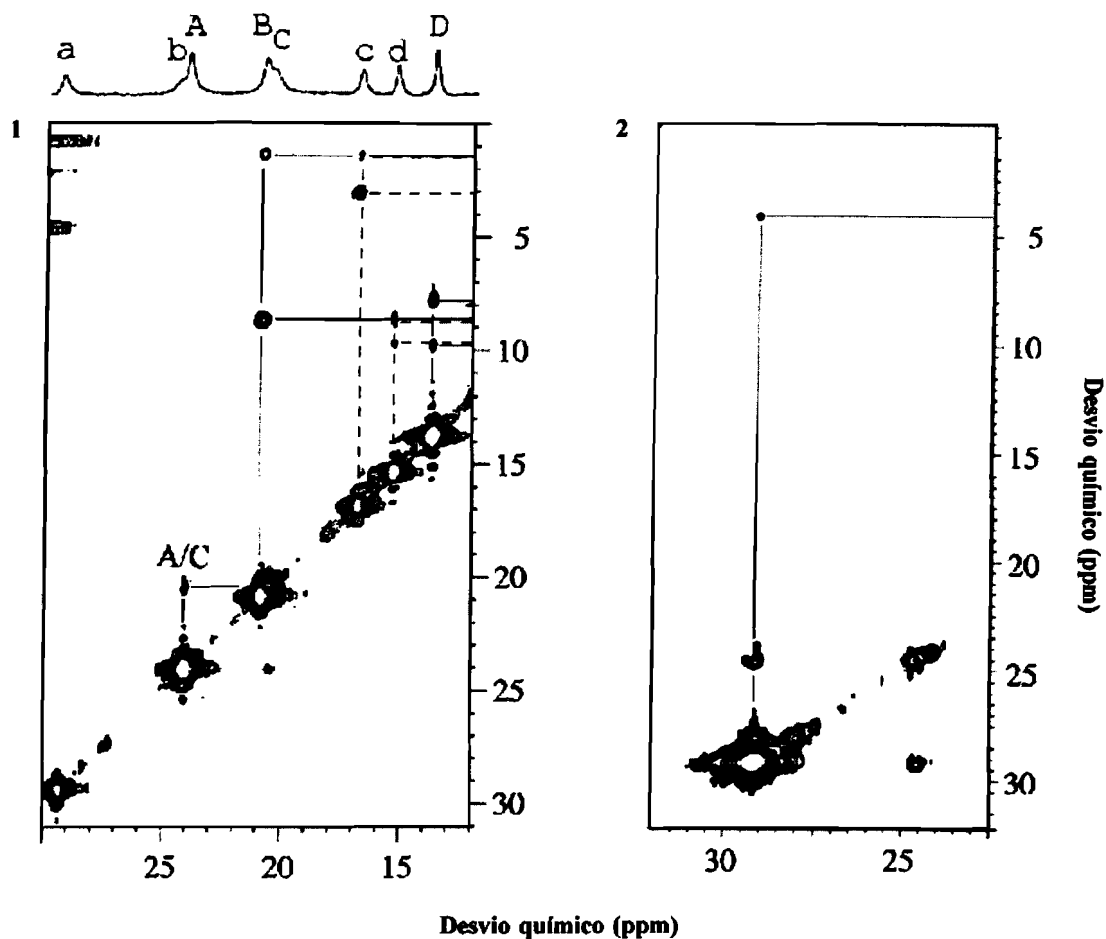
As ressonâncias do estado oxidado atribuídas aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> da Cys 50 têm uma dependência com a temperatura do tipo *Curie*, enquanto todos os outros prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> apresentam uma dependência *anti-Curie* [1]. O estado intermediário apresenta um comportamento similar: as ressonâncias D e outra a 7.8 ppm têm uma dependência com a temperatura do tipo *Curie*, enquanto que as ressonâncias A, B, C e a ressonância a 8.7 ppm têm uma dependência *anti-Curie*.

### ***III.4.2. Experiências de NOE em RMN de próton de 1D e 2D***

De forma a entender as alterações detectadas nos sinais hiperfínos mais desviados do espectro de RMN de próton da  $DgFdII_{int}$  (Figura III.1.), tentou fazer-se a atribuição específica dos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas 8, 14 e 50. Isto foi feito realizando experiências NOESY 2D com tempos de mistura curtos, da ordem dos 2-10 ms (devido aos tempos de relaxação desses prótons, afectados pelo paramagnetismo do agregado), a diferentes temperaturas (290-310 K), e também experiências de NOE 1D.

Na Figura III.3.2. é apresentado o espectro NOESY 2D, com um tempo de mistura de 10 ms a uma temperatura de 303 K. A ressonância **a** apresenta uma correlação com uma ressonância a 4.1 ppm, a qual, baseada nas intensidades dos picos cruzados, pode ser atribuída ao próton  $\alpha$ -CH da cisteína 50. Fica assim concluída a atribuição específica de todos os prótons dos três ligandos cisteicos que coordenam o agregado [3Fe-4S] na  $DgFdII_{ox}$  (ver Tabela III.1).

As correlações detectadas no espectro NOESY 2D com um tempo de mistura de 8 ms, de uma mistura de  $FdII_{ox}$ (42%) /  $FdII_{int}$ (58%), são apresentadas na Figura III.3.1. A percentagem de cada uma das espécies foi estimada por integração dos picos **d** e **D** pertencentes aos estados oxidado e intermediário, respectivamente.



**Figura III.3.** Região a campo baixo dos espectros de NOESY 2D de RMN (1- tempo de mistura de 8 ms e 2- tempo de mistura de 10 ms ) de protão de uma mistura de  $DgFdII_{ox}/DgFdII_{int}$  em  $^2H_2O$  a 303 K. O quociente  $FdII_{ox}/FdII_{int}$  é de 42/58. As linhas a cheio representam as correlações entre as diferentes ressonâncias. As ressonâncias no espectro de RMN de 1D de protões marcadas de **a-d** pertencem ao estado oxidado e as de **A-D** ao estado intermediário.

As correlações detectadas entre as ressonâncias **A** e **C**, **B** e uma ressonância a 8.7 ppm, e **D** e uma ressonância a 7.8 ppm, permitem que estas ressonâncias sejam atribuídas aos

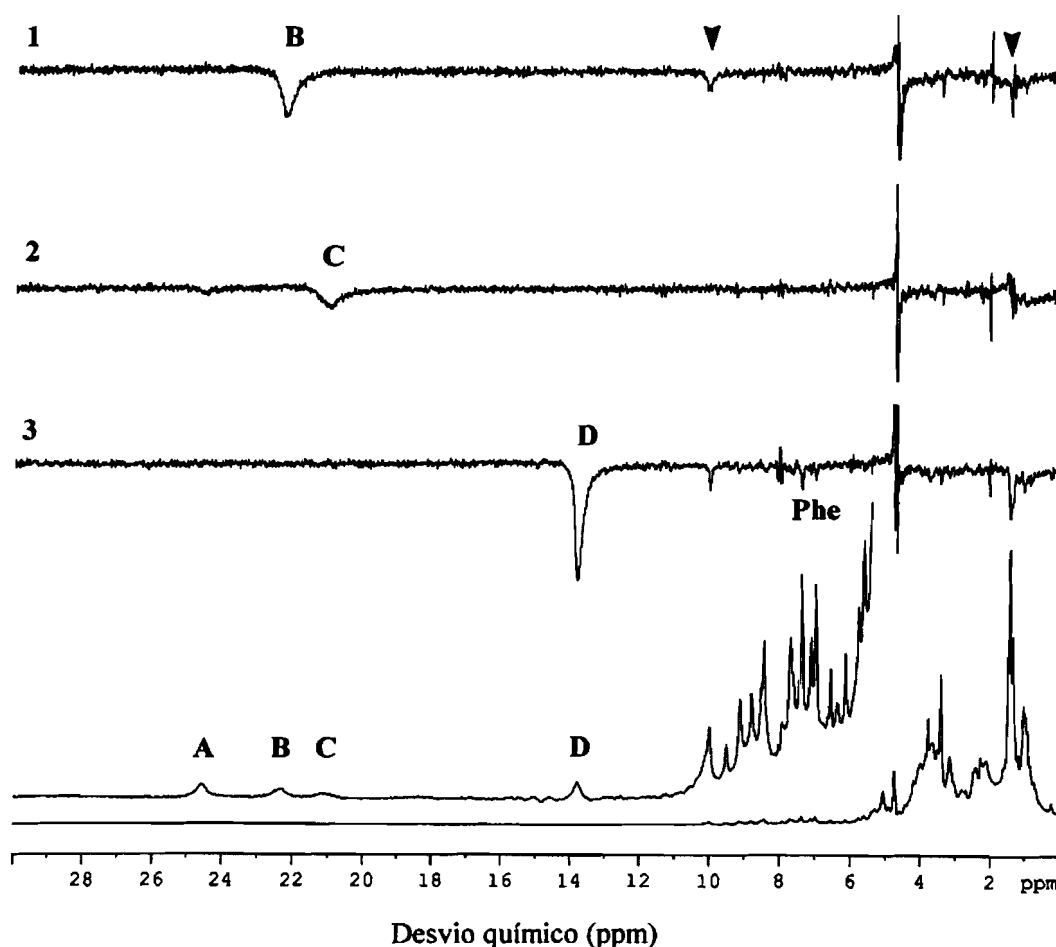
seis prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> dos ligandos cisteicos que coordenam o agregado 3Fe, no estado intermediário. A ressonância **B** apresenta também uma correlação com uma ressonância a 1.4 ppm, bem como a ressonância **D** com uma ressonância a 9.8 ppm. Com base na intensidade dos picos cruzados observados, e no valor de  $T_1$  (Os valores de  $T_1$  para as ressonâncias **A**, **B**, **C**, **D**, e a ressonância a 9.8 ppm, são apresentados na Tabela III.1.) para a ressonância a 9.8 ppm, atribui-se as ressonâncias a 1.4 e 9.8 ppm a prótons  $\alpha$ -CH.

Na Figura III.4. são apresentadas as experiências de NOE a uma dimensão realizadas para uma amostra de *DgFdII* praticamente na sua totalidade no estado intermediário. Os espectros foram obtidos por irradiação dos picos **B** (Figura III.4. – 1), **C** (Figura III.4. – 2) e **D** (Figura III.4. – 3). É interessante notar, que tal como para a *DgFdII*<sub>ox</sub>, em que a irradiação do pico **d**, tinha um efeito nas ressonâncias da fenilalanina 22 [1], também neste caso, a irradiação do pico **D**, apresenta esse efeito. Esta informação vai ser de importância crucial na atribuição específica das ressonâncias dos prótons dos ligandos que coordenam o centro 3Fe, como veremos na secção III.4.3. Para além disso, a irradiação deste pico **D**, provoca também um efeito numa radiação a cerca de 10 ppm, pertencente ao próton  $\alpha$ -CH do mesmo resíduo cisteico.

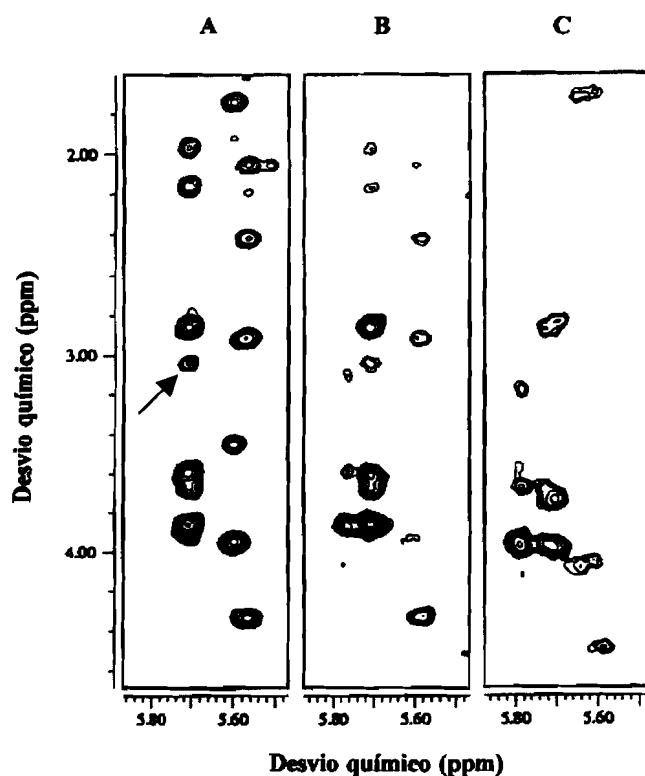
Como se pode também verificar, a irradiação do pico **B**, provoca um efeito nas ressonâncias a cerca de 10.3 ppm e 1.8 ppm, atribuídas ao outro próton  $\beta$ -CH e ao próton  $\alpha$ -CH, respectivamente, do mesmo resíduo coordenante (ver também Figura III.3.1.), bem como a irradiação do pico **C** provoca um efeito semelhante no pico **A**, que como referido anteriormente, são ambos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> do mesmo resíduo cisteico. Foram ainda realizados espectros NOESY 2D, com tempos de mistura de 150 ms, para a mesma amostra de *DgFdII*, para os estados oxidado (Figura III.5.A), intermediário (Figura III.5.B) e totalmente reduzido (Figura III.5.C), de modo a poder observar mudanças estruturais na proteína, devidas à abertura da ponte dissulfureto. A Figura III.5. mostra a região de correlação  $H\alpha/H\beta$  entre as



cisteínas 18 e 42 do espectro NOESY obtido para os diferentes estados redox da DgFdII. Pode observar-se que o efeito de NOE encontrado para o pico cruzado H $\alpha$  Cys18/H $\beta$  Cys42 na DgFdII<sub>ox</sub> (Figura III.5.A), é menos intenso no estado intermediário (em que se encontra presente um equilíbrio entre os estados intermediário e oxidado - Figura III.5.B), e desaparece no estado completamente reduzido, em que todas as moléculas de proteína presentes na amostra, possuem a ponte dissulfureto aberta (Figura III.5.C).



**Figura III.4.** Espectros de NOE 1D de RMN de próton, a 600 MHz e 310 K, da DgFdII no estado intermediário, obtidos por irradiação dos picos B, C e D.



**Figura III.5.** Região do espectro de NOESY 2D de RMN de próton a 600 MHz e 300 K, com um tempo de mistura de 150 ms da  $DgFdII_{ox}$  (A),  $DgFdII_{int} + DgFdII_{ox}$  (B) e  $DgFdII_{red}$  (C). A seta em (A), indica o pico cruzado que correlaciona o próton  $H\alpha$  da cisteína 18 com o próton  $H\beta$  da cisteína 42. Em (B) este pico cruzado é menos intenso do que em (A), e desaparece completamente em (C) quando a proteína é reduzida.

#### III.4.3. Atribuição específica das ressonâncias dos prótons do agregado $[3Fe-4S]^{+1}$ do estado intermediário

A atribuição específica dos prótons  $\beta-CH_2$  das cisteínas 8, 14 e 50 que coordenam o centro  $[3Fe-4S]$  no estado intermediário, foi baseada nas experiências descritas na secção

anterior, nomeadamente nas experiências NOE 1D e NOESY 2D com tempos de mistura curtos. As correlações obtidas, são apresentadas na Tabela III.1.

Observando a Figura III.4.-3 , pode verificar-se que a saturação do pico **D**, apresenta um efeito de NOE com as ressonâncias dos prótons do anel aromático da fenilalanina 22 (Phe 22). Tal como para o caso do estado oxidado da *DgFdII* [1], e utilizando as coordenadas fornecidas pela estrutura de raios-X da *DgFdII* [12] pode afirmar-se que a Phe 22, o único resíduo aromático presente na proteína, está suficientemente perto ( as distâncias dos prótons aromáticos, numa configuração rígida, a um dos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> são 2.94, 3.82, 4.03, 4.55 e 4.7 Å) para que se verifique um efeito de NOE com os prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> da Cys 14. Conjuntamente com as correlações apresentadas por este pico **D**, com duas ressonâncias a 7.8 e 9.8 ppm e as suas intensidades relativas no espectro NOESY da Figura III.3.-1, pode atribuir-se especificamente o pico **D**, e os picos a 7.8 e a 9.8 ppm aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> e  $\alpha$ -CH respectivamente, da cisteína 14. Neste espectro pode ainda ver-se claramente que a ressonância correspondente ao próton  $\alpha$ -CH deste resíduo, tem aproximadamente o mesmo desvio químico em ambos os estados oxidado e intermediário. Pode ainda afirmar-se que os desvios químicos dos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> não variam drasticamente quando comparados com os da *DgFdII*<sub>ox</sub>. Com base nestas observações pode então fazer-se a atribuição específica das cisteínas 8 e 50. Verifica-se assim que para a cisteína 8 se passa algo de semelhante. Na realidade, ambas as ressonâncias **c** (já atribuída à cisteína 8 em *DgFdII*<sub>ox</sub> [1] ) e **B** apresentam uma correlação com um pico a 1.4 ppm, permitindo a atribuição específica das ressonâncias **B** ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 8.7 ppm ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>) e 1.4 ppm ( $\alpha$ -CH) à cisteína 8 em *DgFdII*<sub>int</sub>.

**Tabela III.1.** Resumo dos parâmetros espectrais de RMN e atribuição das ressonâncias dos prótons das cisteínas coordenantes, para ambas  $DgFdII_{ox}$  e  $DgFdII_{int}$ , a 300K. \* Segundo [1]. n.d. – não determinado.

Cisteína	Prótons	$DgFdII_{ox}$		$DgFdII_{int}$	
		Sínal (ppm)	$T_1$ (ms)	Sínal (ppm)	$T_1$ (ms)
50	$\beta$ -CH	<b>a</b> (29.3)*	4.3*	<b>A</b> (24.1)	3.6
	$\beta$ -CH	<b>b</b> (24.4)*	3.1*	<b>C</b> (20.5)	3.0
	$\alpha$ -CH	(4.1)	n.d.	n.d.	n.d.
14	$\beta$ -CH	<b>d</b> (15.3)*	7.0*	<b>D</b> (13.7)	5.8
	$\beta$ -CH	(8.6)*	n.d.	(7.8)	n.d.
	$\alpha$ -CH	(9.7)*	n.d.	(9.8)	16.4
8	$\beta$ -CH	<b>c</b> (16.8)*	4.0*	<b>B</b> (20.8)	3.2
	$\beta$ -CH	(3.0)*	n.d.	(8.7)	n.d.
	$\alpha$ -CH	(1.43)*	n.d.	(1.4)	n.d.

As atribuições prévias das ressonâncias **B** e **D**, e a correlação apresentada pelas ressonâncias **A** e **C** ( Figuras III.3. (1) e III.4), em tudo muito semelhante ao que se passa para o estado oxidado, permite concluir que estas ressonâncias **A** ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>) e **C** ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>), pertencem ao terceiro ligando do centro metálico, a cisteína 50. É curioso verificar que tal como em  $DgFdII_{ox}$ , se revela difícil atribuir o próton  $\alpha$ -CH desta cisteína.

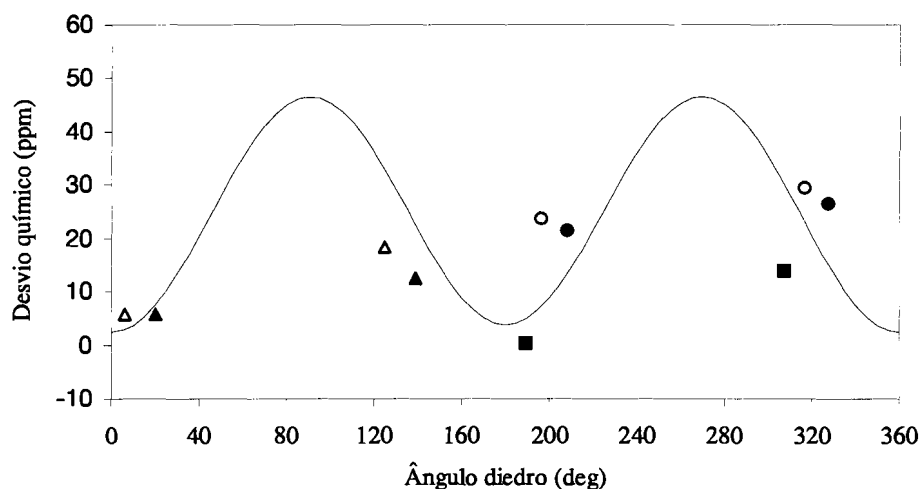
#### III.4.4. Dependência angular das ressonâncias paramagnéticas

De modo a investigar melhor as mudanças estruturais nas proximidades do agregado [3Fe-4S] na  $DgFdII_{int}$ , foi gerada uma curva dos desvios químicos de contacto dos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> pertencentes aos ligandos cisteicos, *versus* os correspondentes ângulos diedros Fe-S $\gamma$ -

$C\beta-H\beta$  ( $\theta$ ) para as ferredoxinas de 3Fe. (Figura III.6.) . Foram utilizados os desvios químicos experimentais dos prótons  $\beta-CH_2$  dos ligandos cisteicos do centro  $[3Fe-4S]$  das FdII de *Dg* [1] e Fd 7Fe de *Azotobacter vinelandii* (Av) [13], após subtração de 2.8 ppm , que é o valor do desvio químico intrínseco para um próton  $\beta-CH_2$  assumindo que o termo de contacto é predominante [14], juntamente com os valores de  $\theta$  obtidos a partir das estruturas cristalinas de raios-X das ferredoxinas de *Dg* [12] e Av [15,16]. Os dois prótons  $\beta-CH_2$  foram estereoespecificamente atribuídos a  $\beta-CH_a$  e  $\beta-CH_b$ , baseados nas respectivos distancias ao átomo de ferro, coordenado pela cisteína à qual os prótons pertencem. O ajustamento foi obtido, utilizando uma versão modificada da equação de Karplus [17], a qual fornece uma dependência angular dos desvios isotrópicos que são afectados pela transferência de densidade de spin através das ligações, entre os átomos de ferro do agregado e os prótons  $\beta-CH_2$  das cisteínas que o coordenam. Esta equação traduzida pela relação  $\delta = a \sin^2 (\theta) + b \cos (\theta) + c$ , (equação III.1), é uma combinação das equações  $\delta = a' \cos^2 (\theta) + b' \cos (\theta) + c'$  (1), e  $\delta = a'' \sin^2 (\theta) + c''$  (2), que traduzem respectivamente uma mecanismo de deslocalização de spin  $\sigma$  e  $\pi$ , em que  $a = a'' - a'$ ,  $b = b'$  e  $c = a' + c' + c''$ . Um valor de  $a$  maior que zero, indica uma predominância do mecanismo de deslocalização de spin do tipo  $\pi$ , enquanto que um valor de  $b$  diferente de zero sugere que o mecanismo  $\sigma$  da equação III.1, não deverá ser negligenciado. Esta equação tem assim em conta ambos os mecanismos  $\sigma$  e  $\pi$  de deslocalização de spin que podem ocorrer no tipo de ligandos em questão, e foi primeiramente utilizada para determinar a orientação dos ligandos em sistemas de  $[4Fe-4S]^{+2}$  [17] e compostos modelo de  $[4Fe-4S]^{+3}$  [18]. Neste caso de um sistema de  $[3Fe-4S]$ , foi introduzido no programa de simulação um possível erro, tanto no desvio químico, como no ângulo diedro ( $\theta$ ), para cada um dos prótons das três diferentes cisteínas.

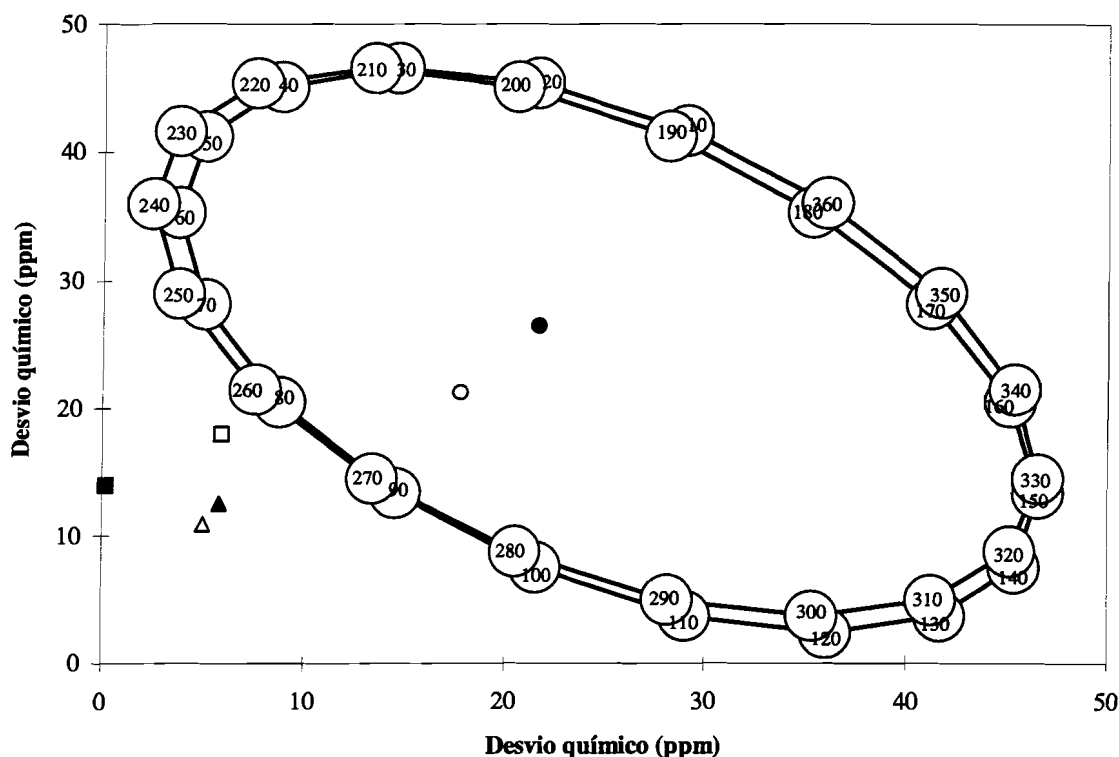
A melhor aproximação para a equação, utilizando um erro de 5 ppm para os desvios químicos e 10 graus para os ângulos diedros, com uma precisão de 0.01, originou valores de

43.5, -0.66 e 3.04 para **a**, **b** e **c** respectivamente. De forma a calcular os valores de  $\theta$ , a equação III.1 é resolvida para cada um dos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das três cisteínas 8,14 e 50, tendo em conta os valores de desvio químico obtidos experimentalmente para cada um deles.



**Figura III.6.** Melhor ajuste para a versão modificada da equação de Karplus  $\delta = a \sin^2(\theta) + b \cos(\theta) + c$ , para a curva dos desvios de contacto dos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> dos resíduos cisteicos *versus* os ângulos diedros,  $\theta$ , para sistemas de [3Fe-4S]. Os valores obtidos para as constantes são **a** = 43.5, **b** = -0.66 e **c** = 3.04. Os valores utilizados para a precisão, desvio standard ao desvio químico e desvio standard ao ângulo diedro foram 0.01, 5 e 10 respectivamente. Os desvios químicos experimentais utilizados foram os de *DgFdII* [1], e *AvFd* (7Fe) [13]. Os valores de  $\theta$  foram obtidos a partir das estruturas de raios-X das ferredoxinas de *Dg* [12] e *Av* [15,16]. *DgFdII* (● - Cys 50, ▲ - Cys 14, ■ - Cys 8). *AvFd* (○ - Cys 49, Δ - Cys 16).

Obtêm-se quatro valores de  $\theta$  ( Fe-Sγ-Cβ-Hβ ) possíveis, para cada uma das cisteínas, que diferem entre si dois a dois de  $\approx 120^\circ$ . Isto resulta do facto da equação III.1 poder gerar mais do que um par de valores de  $\theta$  diferentes entre si de  $120^\circ$ , por cada par de valores de desvio químico, originando assim mais do que uma solução.



**Figura III.7.** Determinação dos ângulos diedros ( $\text{Fe-S}\gamma\text{-C}\beta\text{-C}\alpha$ ) para os ligandos cisteicos do agregado  $[3\text{Fe-4S}]$  da  $DgFdII_{int}$ . A figura representa uma projecção da relação entre os desvios químicos dos prótons  $\beta\text{-CH}_a$  (eixo dos X) e  $\beta\text{-CH}_b$  (eixo dos Y). A curva representada com os respectivos valores de  $\theta$ , é gerada a partir equação modificada de Karplus (equação III.1).  $DgFdII_{ox}$  (● - Cys 50, ▲ - Cys 14, ■ - Cys 8)  $DgFdII_{int}$  (○ - Cys 50, △ - Cys 14, □ - Cys 8).

Assim sendo, torna-se necessário recorrer a uma forma de eliminar esta indeterminação, que é possível através de um gráfico que relaciona ambos os desvios químicos apresentados pelos prótons  $\beta\text{-CH}_a$  e  $\beta\text{-CH}_b$  com o ângulo diedro gerado pela equação III.1, tendo em conta os valores de  $a$ ,  $b$  e  $c$  obtidos (Figura III.7.). Pelo gráfico, uma das soluções é sempre eliminada, tendo em conta que ambos os prótons  $\beta\text{-CH}_a$  e  $\beta\text{-CH}_b$  para cada um dos resíduos cisteicos se mantêm do estado oxidado para o estado intermediário. A

segunda solução não considerada, iria obrigatoriamente implicar que o próton  $\beta\text{-CH}_a$  do estado oxidado, passa-se a ser  $\beta\text{-CH}_b$  no estado intermediário. Como pode observar-se, a cisteína 50 é a que mais longe se encontra da curva gerada, o que na realidade era esperado, pois das 3 cisteínas é esta que apresenta um comportamento diferenciado das outras duas (ver Figura III.2.), reflectido na dependência da temperatura dos respectivos prótons  $\beta\text{-CH}_2$ . Os valores de ângulo diedro  $\theta$  ( Fe-S $\gamma$ -C $\beta$ -C $\alpha$  ) obtidos com este procedimento para a  $DgFdII_{int}$  estão presentes na Tabela III.2., e comparados com os obtidos a partir da estrutura cristalina da  $DgFdII$  no estado oxidado [12].

**Tabela III.2.** Comparação dos valores de ângulo diedro  $\theta$  ( Fe-S $\gamma$ -C $\beta$ -C $\alpha$  ) para a  $DgFdII_{ox}$  e  $DgFdII_{int}$ . Os valores foram obtidos a partir da estrutura de raios-X para o estado oxidado [12], e do processo já descrito nesta secção resultante das figuras III.6 e III.7. para o estado intermediário.

Ângulo diedro $\theta$ ( Fe-S $\gamma$ -C $\beta$ -C $\alpha$ )		
Cisteína	$DgFdII_{ox}$	$DgFdII_{int}$
8	68.3	$261 \pm 8^\circ$
14	259.5	$265 \pm 20^\circ$
50	87.7	$268 \pm 15^\circ$

### III.5. Conclusões

Analisando a dependência com a temperatura dos três pares de ressonâncias  $\beta\text{-CH}_2$  do estado intermediário (Figura III.2.), verifica-se que estas apresentam um comportamento



típico de todas as ferredoxinas que contêm centros  $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$ , incluindo a  $DgFdII_{ox}$  [2]. A assimetria encontrada para o acoplamento entre os três átomos  $\text{Fe}^{3+}$  ( $S=5/2$ ), é reflectida no espectro de RMN pela presença de uma dependência com a temperatura do tipo *Curie* para uma das cisteínas coordenantes, e *anti-Curie* para as restantes duas. A diferença encontrada para a  $DgFdII_{int}$ , reside no facto de que não é mais a cisteína 50 que apresenta um comportamento *Curie*, como se observa para a  $DgFdII_{ox}$  [2], mas sim a cisteína 14.

Utilizando experiências de NOE 1D e NOESY 2D com tempos de mistura curtos e as dependências com a temperatura referidas em cima, foi possível fazer a atribuição específica de todos os prótons  $\beta\text{-CH}_2$  das cisteínas que coordenam o centro de 3Fe e ainda os prótons  $\alpha\text{-CH}$  das cisteínas 8 e 14, no estado intermediário da  $DgFdII$ , bem como completar a atribuição específica para os mesmos resíduos na  $DgFdII_{ox}$ , com a atribuição do próton  $\alpha\text{-CH}$  da cisteína 50. Pode observar-se que os desvios químicos de cada par de prótons  $\beta\text{-CH}_2$  não variam drasticamente quando comparados com os da  $DgFdII_{ox}$ , sendo os desvios químicos dos prótons  $\alpha\text{-CH}$  (detectados somente para as cisteínas 8 e 14) mantidos. É também interessante verificar que a amplitude de desvios químicos das ressonâncias dos prótons  $\beta\text{-CH}_2$  é menor para a  $FdII_{int}$  (entre 8 e 24 ppm) comparada com a  $FdII_{ox}$  (entre 3 e 29 ppm). Isto sugere que rearranjos nas imediações do agregado, nomeadamente alterações nos ângulos diedros Fe-S-C $\alpha$ -C $\beta$ , ou mudanças no acoplamento de spin nos átomos de ferro do agregado, devido à abertura da ponte S-S, estejam a acontecer. Pode ainda inferir-se que os ângulos diedros para os resíduos cisteicos coordenantes tenham tendência a tornar-se mais iguais quando se passa da  $FdII_{ox}$  para  $FdII_{int}$  ( Se todos os ângulos diedros forem iguais, então todos os desvios químicos dos prótons  $\beta\text{-CH}_2$  seriam iguais ), o que se verifica, como pode observar-se na Tabela III.2. A noção que os átomos de ferro se tornam mais equivalentes no estado intermediário, foi já discutida tendo em conta os resultados obtidos por espectroscopia de Mössbauer [3].

Uma evidência directa da quebra da ponte S-S entre as cisteínas 18 e 42 na passagem da  $FdII_{ox}$  para  $FdII_{int}$ , pode ser observada utilizando as atribuições obtidas para o espectro NOESY da  $DgFdII_{ox}$  com um tempo de mistura de 150 ms [19], e as respectivas intensidades dos picos cruzados, na região onde pode ser encontrada a correlação entre o  $H\alpha$  da Cys 18 e o  $H\beta$  da Cys 42 (Figura III.5.), em que a perda de intensidade deste pico cruzado quando se passa da  $FdII_{ox}$  para  $FdII_{int}$  e finalmente o seu desaparecimento em  $FdII_{red}$ , demonstra isso mesmo. A quebra desta ponte S-S parece ser assim o factor que catalisa as mudanças estruturais que resultam na variação dos ângulos diedros das cisteínas que coordenam o centro 3Fe, e consequentemente nas mudanças nos desvios químicos e dependências de temperatura dos prótons  $\beta-CH_2$  das mesmas.

A equação modificada de Karplus (equação III.1), que tem em conta ambos os mecanismos  $\sigma$  e  $\pi$  de transferência de densidade de spin, foi utilizada para calcular o melhor ajuste para os parâmetros experimentais existentes para os sistemas de  $[3Fe-4S]$  (Figura III.6). O valor positivo encontrado para  $a$  (43.5) indica que o mecanismo de transferência de spin é predominantemente  $\pi$ . A curva obtida foi utilizada, conjuntamente com a Figura III.7., para extrair os valores dos ângulos diedros  $Fe-S\gamma-C\alpha-C\beta$  para o estado intermediário da  $DgFdII$ , como descrito na secção III.4.4. Como se pode verificar, existem mudanças nos valores de desvio químico, quando passamos de  $FdII_{ox}$  para  $FdII_{int}$ , o que implica mudanças estruturais no agregado. É de ter em conta que pequenas mudanças nos ângulos diedros podem provocar grandes variações no desvio químico. Os valores para estes ângulos diedros para ambos os estados oxidado e intermediário podem ser observados na Tabela III.2., na qual pode verificar-se que a diferença de ângulos diedros para a cisteína 14 é somente de  $6.5 \pm 20^\circ$ , enquanto que para as cisteínas 8 e 50 esta diferença é muito mais significativa com valores de  $192 \pm 8^\circ$  e  $180 \pm 15^\circ$ , respectivamente. Uma possível explicação, reside no facto indicado pela estrutura de raios-X [12], segundo a qual, os átomos  $S\gamma$  das cisteínas 8 e 50 estão ambos

envolvidos em ligações NH-S-H (NH-S : Ala10-Cys8, Ala31-Cys8, Ala52-Cys50 e Ala54-Cys50). Qualquer mudança estrutural que possa mudar as orientações dos átomos NH relativamente aos átomos Sγ dos ligandos cisteicos, pode resultar numa mudança de orientação para o átomo Sγ. Os NH de ambas as cisteínas 8 e 50 estão também envolvidos em ligações NH-O-H, enquanto que a cisteína 14 não.

Pode assim concluir-se que as propriedades electrónicas do agregado [3Fe-4S] na DgFdII são essencialmente moduladas pelos constrangimentos impostos pela cadeia polipeptídica da proteína, demonstrando a espectroscopia de RMN ser uma técnica única que consegue distinguir diferentes estados redox em proteínas contendo centros de ferro-enxofre, dando informação acerca da estrutura electrónica do agregado, detectando não só pequenas alterações nas imediações deste, bem como da proteína como um todo.

### III.6. Bibliografia

1. Macedo, A. L., Palma, N., Moura, I., LeGall, J., Wray, V., and Moura, J. J. G. (1993) *Magn. Res. Chem.* **31**, S59-S67
2. Macedo, A. L., Moura, I., LeGall, J., Huynh, B., and Moura, J. J. G. (1993) *Inorganic Chemistry* **32**(7), 1101-1105
3. Macedo, A. L., Moura, I., Surerus, K. K., Papaefthymiou, V., Liu, M., LeGall, J., Münck, E., and Moura, J. J. G. (1994) *J.Biol.Chem.* **269**(11), 8052-8058
4. Moura, J. J. G., Moura, I., Kent, T. A., Lipscomb, J. D., Huynh, B. H., LeGall, J., Xavier, A. V., and Münck, E. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 6259-6267
5. Gorst, C. M., Zhou, Z. H., Ma, K., Teng, Q., Howard, J. B., Adams, M. W. W., and La Mar, G. N. (1995) *Biochemistry* **34**, 8788-8795
6. Bruschi, M., Hatchikian, C., LeGall, J., Moura, J. J. G., and Xavier, A. V. (1976) *Biochem. Biophys. Acta* **449**, 275-284
7. Inubushi, T., and Becker, E. D. J. (1983) *J.Magn.Res.* **51**, 128-133
8. Bertini, I., Briganti, F., Luchinat, C., Scozzafava, A., and Sola, M. (1991) *J.Am.Chem.Soc.* **113**, 1237-1245
9. Macura, S. R., and Ernst, R. R. (1980) *Mol.Phys.* **40**, 95
10. Kumar, A., Ernst, R. R., and Wüthrich, K. (1980) *Biochem.Biophys.Res.Com.* **95**, 1
11. Vold, R. L., Waugh, J. S., Klein, M. P., and Phelps, D. E. (1968) *J.Chem.Phys.* **48**, 3831
12. Kissinger, C. R., Sieker, L. C., Adman, E. T., and Jensen, J. H. (1991) *J.Mol.Biol.* **219**, 693-715
13. Cheng, H., Grohmann, K., and Sweeney, W. (1992) *J.Biol.Chem.* **267**, 8073-8080
14. Davy, S. L., Osborne, M. J., Breton, J., Moore, G. R., Thomson, A. J., Bertini, I., and Luchinat, C. (1995) *FEBS Letters* **363**, 199-204
15. Imai, T., Matsumoto, T., Ohta, S., Ohmori, D., Suzuki, K., Tanaka, J., Tsukioka, M., and Tobar, J. (1983) *Biochim.Biophys.Acta* **743**, 91-97
16. Trower, M. K., Emptage, M. H., and Sariaslani, F. S. (1990) *Biochem.Biophys.Acta* **1037**, 281-289
17. Bertini, I., Capozzi, F., Luchinat, C., Piccioli, M., and Vila, A. J. (1994) *J.Am.Chem.Soc.* **116**, 651-660
18. Mouesca, J. M., Rius, G., and Lamotte, B. (1993) *J.Am.Chem.Soc.* **115**, 4714-4731

19. Goodfellow, B. J., Macedo, A. L., Rodrigues, P., Wray, V., Moura, I., and Moura, J. J. G. (1999) *JBIC* **4**, 421-430



## CAPÍTULO IV

### **O modelo de acoplamento de spins para o estado intermediário da $DgFdII$**

## **O modelo de acoplamento de spins para o estado intermediário da $DgFdII$**

IV.1. Objectivo	107
IV.2. Considerações teóricas	107
IV.3. O modelo aplicado aos estados intermediário e oxidado da $DgFdII$ ; os valores de $J$ e de $A$	110
IV.4. Estudo qualitativo do modelo de acoplamento de spins para a $DgFdII_{int}$	116
IV.5. Conclusões	123
IV.6. Bibliografia	125



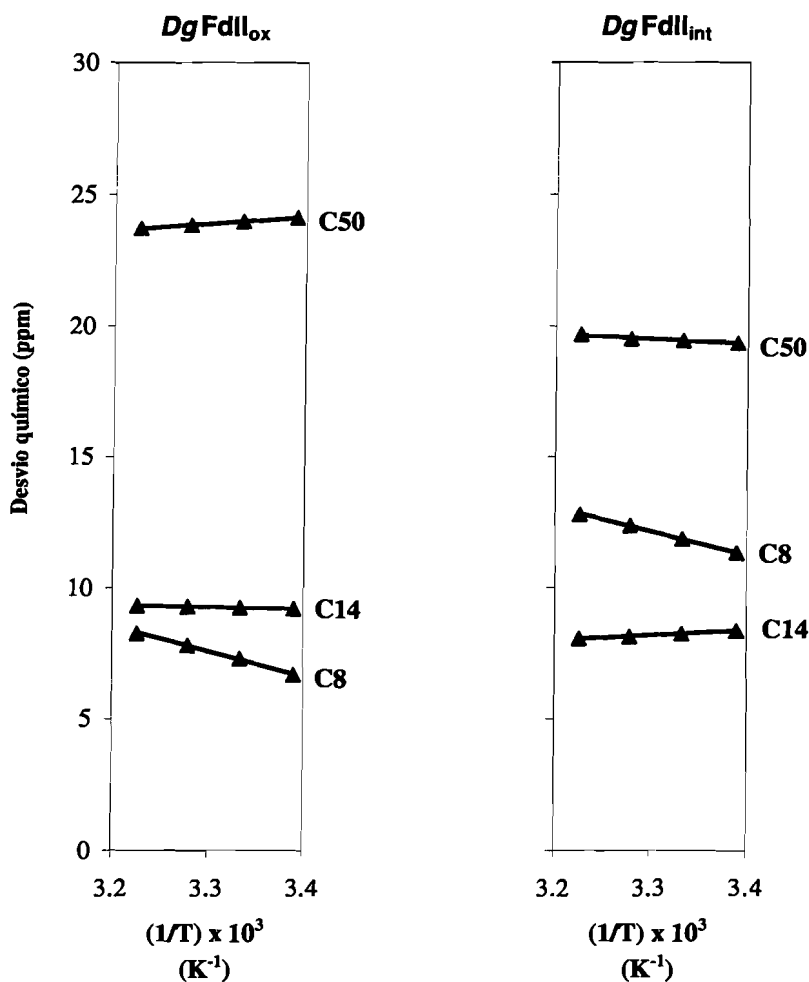
## IV.1. Objectivo

Neste capítulo é introduzido um novo modelo de acoplamento de spins, que juntamente com os dados obtidos por RMN no capítulo anterior, permita determinar as constantes de acoplamento,  $J$ , dos ferros do agregado metálico para o estado intermediário da ferredoxina II de *D.gigas*.

## IV.2. Considerações teóricas

Várias foram já as técnicas utilizadas, numa tentativa de determinação das constantes de acoplamento entre os três átomos de ferro para a  $DgFdII_{ox}$ . A partir dos resultados provenientes de estudos de RPE e Mössbauer foi já possível obter informação detalhada acerca do estado electrónico fundamental [1-3], tendo sido deduzido que a força relativa das interacções de acoplamento de permuta seriam da mesma ordem de grandeza [4]. O cálculo da ordem de grandeza destas interacções, não era no entanto possível, devido a falta de informação sobre os estados excitados, em consequência das medidas de RPE e Mössbauer serem realizadas a baixas temperaturas. Trabalho posterior de análise do comportamento da relaxação em RPE, por variação da temperatura [5] e a simulação dos espectros [6,7], apontam para uma constante de acoplamento de  $40\text{cm}^{-1}$ . Mais tarde, medidas de susceptibilidade magnética, determinam um valor mínimo de  $200\text{cm}^{-1}$  para a constante de acoplamento [8]. Recentemente, um modelo de acoplamento de spins descrito pelo Hamiltoniano de spin de Heisenberg-Dirac-van Vleck, foi utilizado para descrever o estado oxidado da  $DgFdII$  [9], e encontra-se descrito em II.4.

Os parâmetros utilizados não explicam no entanto, as dependências com a temperatura das ressonâncias dos três pares de prótons  $\beta\text{-CH}_2$  pertencentes aos resíduos cisteicos que coordenam o agregado  $[3\text{Fe-4S}]$  na  $DgFdII_{\text{int}}$ , representadas na figura IV.1.



**Figura IV.1.** Dependência com a temperatura do desvio químico médio das ressonâncias dos três pares de prótons  $\beta\text{-CH}_2$  pertencentes aos três ligandos (Cys 8, 14 e 50) que coordenam o agregado de 3Fe, para os estados oxidado ( $DgFdll_{\text{ox}}$ ) e intermediário ( $DgFdll_{\text{int}}$ ).

O comportamento com a temperatura *Curie* apresentado por estes pares de prótons, para a cisteína 14 e *anti-Curie* para as cisteínas 8 e 50, conjuntamente com os valores de

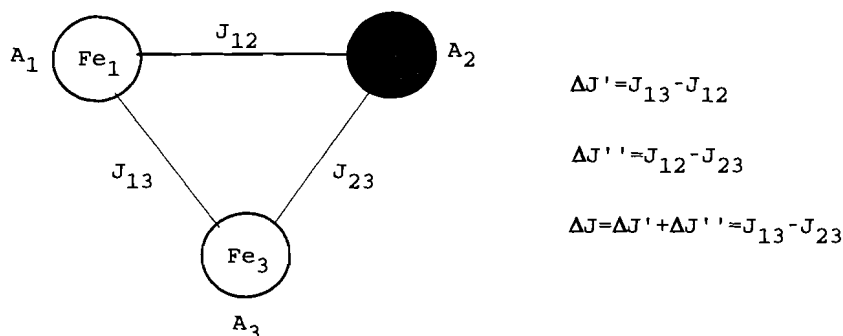
desvio químico apresentados, só poderão ser explicados com valores diferentes da constante de acoplamento de spin nuclear (ou constante de acoplamento hiperfino isotrópico),  $A$ , entre cada um dos pares e o átomo de ferro coordenado ao resíduo cisteico a que pertencem, ou então com diferentes valores de constante de acoplamento,  $J$ , entre os três átomos de ferro.

A constante  $A$  relacionada directamente com o desvio químico ( capítulo II, expressão (4) ) é dependente da densidade electrónica de spins desemparelhados no núcleo H e também da orientação dos ligandos cisteicos, ou seja dos ângulos diedros  $\text{Fe-S}\gamma\text{-C}\beta\text{-C}\alpha$ . No entanto, o centro  $[3\text{Fe-4S}]$  permanece no mesmo estado de oxidação em ambos os estados oxidado e intermediário da *DgFdII*, não parecendo haver assim diferença na densidade de spin entre cada um deles. A diferença nas dependências de temperatura e desvios químicos, ao passar-se de  $\text{FdII}_{\text{ox}}$  para  $\text{FdII}_{\text{int}}$ , deverá então resultar numa mudança de ângulos diedros  $\text{Fe-S}\gamma\text{-C}\beta\text{-C}\alpha$  no agregado, como resultado directo da quebra da ponte S-S entre as cisteínas 18 e 42, causando ou permitindo uma diferente distribuição da densidade de spin no agregado.

Como resposta a este problema, foi desenvolvido um modelo, que além de considerar possível a existência de três valores de  $J$  diferentes;  $J_{12}$ ,  $J_{13}$  e  $J_{23}$ , (1,2,3 referem-se aos sítios férricos  $\text{Fe}_1$ ,  $\text{Fe}_2$  e  $\text{Fe}_3$ ), admite ainda a possibilidade de diferentes valores de  $A$ , para cada um dos átomos de ferro. A análise deste modelo assume também como o modelo desenvolvido para a *DgFdII*<sub>ox</sub> [9], que um dos sítios ferro possa ser distinguido dos outros dois sítios com base nas interações de permuta de acoplamento, facto este que é traduzido pelos desvios químicos do par de prótons  $\beta\text{-CH}_2$  de uma das cisteínas apresentarem uma dependência com a temperatura diferente dos outros dois pares pertencentes às restantes duas cisteínas que coordenam o centro de 3Fe.

### IV.3. O modelo aplicado aos estados intermediário e oxidado da DgFdII; os valores de J e de A

O modelo de acoplamento para o estado intermediário pode ser esquematizado da seguinte forma:



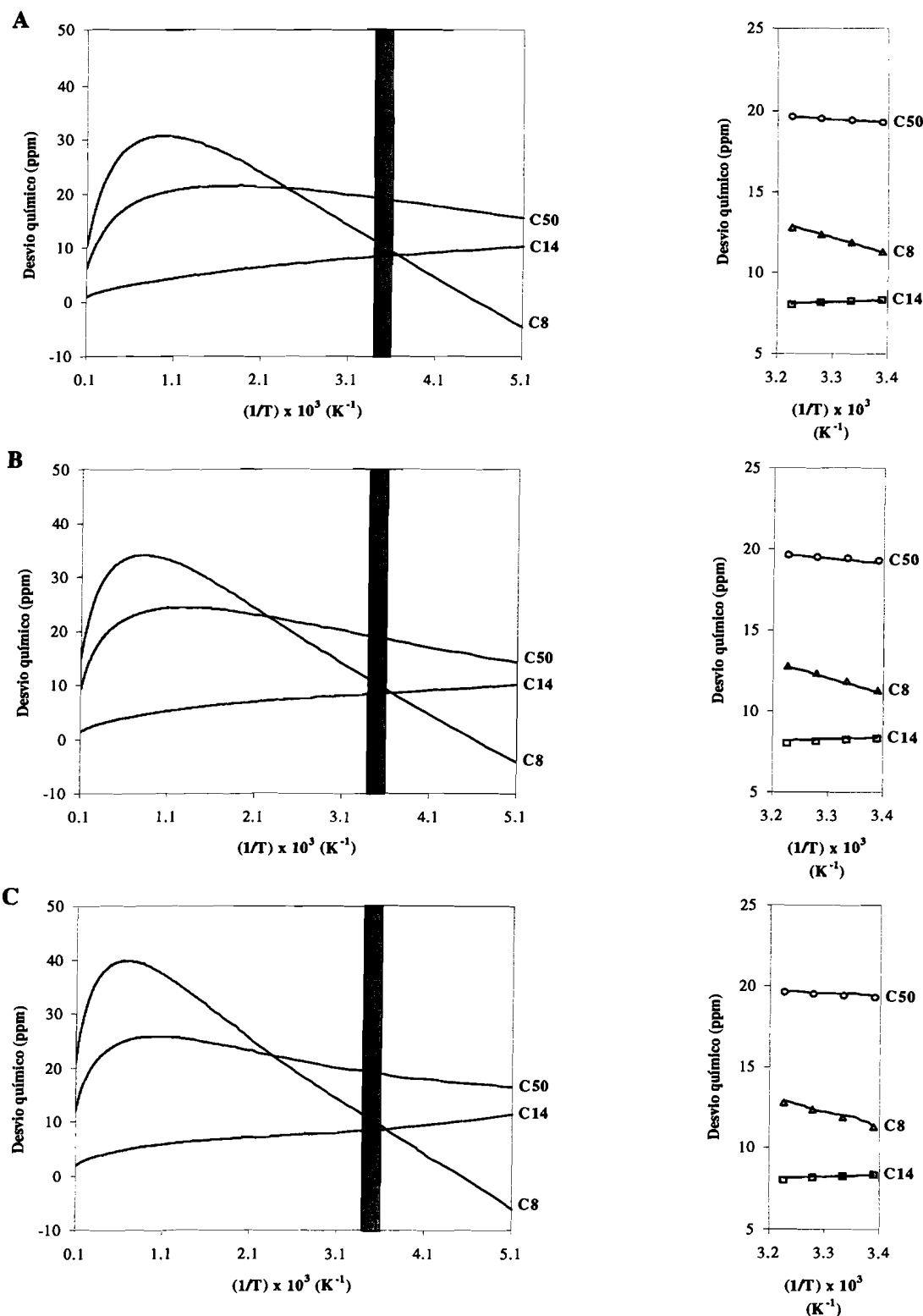
em que Fe<sub>1</sub>, Fe<sub>3</sub> e Fe<sub>2</sub> representam os átomos de ferro coordenados às cisteínas 8, 50 e 14 respectivamente, assumindo-se assim a cisteína 14 coordenada ao sítio Fe<sub>2</sub>, como aquela que apresenta um comportamento diferente das outras duas. Os diferentes J representam as constantes de acoplamento entre cada um dos átomos de ferro 1,2 e 3, e A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub> são as constantes de acoplamento de spin nuclear entre cada um dos átomos de ferro e os prótons β-CH<sub>2</sub> da cisteína coordenante. Para determinar os valores de J e ΔJ, assume-se ainda que J<sub>12</sub> e J<sub>23</sub> são valores relativamente próximos um do outro e inferiores a J<sub>13</sub>, atendendo a que Fe<sub>2</sub> representa o sítio Fe que coordena a cisteína 14 em DgFdII<sub>int</sub>, como já foi anteriormente referido.

Foram realizadas varias simulações, fazendo-se variar em cada uma delas os valores de J<sub>12</sub>, J<sub>13</sub>, J<sub>23</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>, de forma a obter a curva mais aproximada para cada uma das

cisteínas coordenantes do agregado 3Fe, representativa da dependência com a temperatura dos desvios químicos das ressonâncias de contacto calculadas para os prótons  $\beta\text{-CH}_2$  das mesmas, e do próprio valor intrínseco de desvio químico para os referidos prótons. Uma tabela com os resultados obtidos é apresentada em IV.1.

**Tabela IV.1.** Valores obtidos para as variáveis consideradas no modelo de acoplamento de spins para o  $DgFdII_{\text{int}}$ , em três diferentes casos em que se consideram valores para as constantes de acoplamento da ordem dos 400, 300 e 200  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente, e que representam o melhor ajuste à curva representativa dos valores de desvio químico dos prótons  $\beta\text{-CH}_2$  das cisteínas 8, 14 e 50 e a sua dependência com a temperatura.

$DgFdII_{\text{int}}$			
	A	B	C
$J_{12}$	199	308	446
$J_{13}$	223	331	467
$J_{23}$	193	302	439
$A_1$	1.35	2.11	3.34
$A_2$	0.119	0.193	0.295
$A_3$	0.80	1.32	1.91
$\Delta J$	30	29	28
$\Delta J'$	24	23	21
$\Delta J''$	6	6	7

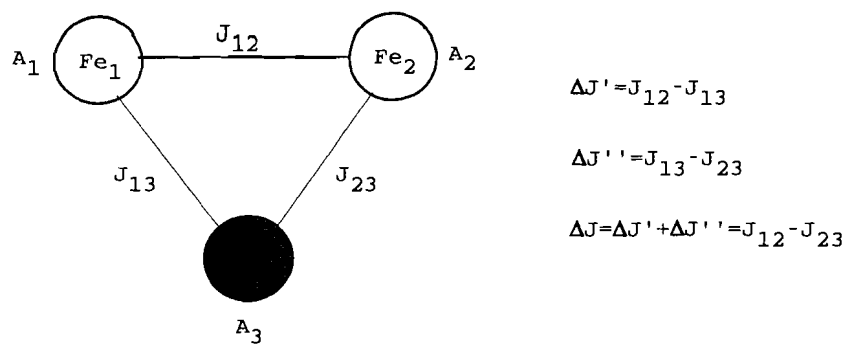


**Figura IV.2.** Curvas teóricas obtidas a partir do modelo da dependência com a temperatura do desvio químico das ressonâncias de contacto calculadas para os prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> coordenados ao centro [3Fe-4S] da *DgFdII*<sub>int</sub>. A,B e C, representam os três casos referidos na Tabela V.1. A cinza, encontra-se delimitada a gama de temperaturas da RMN, a qual pode ser observada com pormenor à direita em que se sobrepõem os valores experimentais obtidos na gama de temperaturas da RMN (com os símbolos  $\circ$ ,  $\Delta$ ,  $\square$ ) com as curvas teóricas.

Na Figura IV.2. podem observar-se as curvas teóricas geradas pelo modelo para os três casos A, B e C referidos na Tabela IV.1., e a sua validação para o caso da *DgFdII<sub>int</sub>*, ao serem sobrepostas com os dados experimentais obtidos por RMN, na gama de temperaturas de 295-310 K e verificar-se uma concordância quase perfeita.

Ao serem analisados os valores de *J*,  $\Delta J$  e *A*, verifica-se que o tipo de andamento das curvas teóricas está fortemente dependente dos mesmos, senão vejamos; ao serem mudados os valores de *J* da ordem dos 200 cm<sup>-1</sup> (caso A) para 300 cm<sup>-1</sup> (caso B) ou 400 cm<sup>-1</sup> (caso C), a concordância das curvas teóricas com os valores experimentais, só continua a ser possível se os valores dos  $\Delta J$  e *A* variarem também. Assim, embora se consiga uma concordância entre os valores teóricos e experimentais para a gama em que é possível obtê-los, observa-se que o tipo de andamento global das curvas teóricas varia de caso para caso. Seria já de esperar este tipo de resultados, uma vez que os declives das dependências de temperatura são fortemente dependentes dos valores de  $\Delta J$ , sendo os valores de desvio químico dos prótons na RMN boas medidas do valor de *J*, dado as energias dos multipletos de spin serem determinadas pelo valor de *J* e os desvios químicos o resultado de uma média térmica desses níveis de energia. Uma certa lógica na variação do valor das variáveis é também evidenciada pela Tabela IV.1. À medida que os valores dos *J* aumentam, os valores dos *A* aumentam com uma certa proporcionalidade, acontecendo o inverso aos valores de  $\Delta J$  e  $\Delta J'$ . Como seria de esperar, o valor de  $\Delta J''$  mantém-se praticamente inalterável, confirmando a semelhança entre os dois sítios férricos.

Aplicou-se também este modelo desenvolvido para a *DgFdII<sub>int</sub>*, ao estado oxidado (*DgFdII<sub>ox</sub>*), de forma a testar não só a sua veracidade na aplicação a sistemas de [3Fe-4S] de um modo mais global, mas também para se comparar com o modelo previamente desenvolvido para a *DgFdII<sub>ox</sub>* [9]. Esquematizou-se o modelo para o estado oxidado, tal como foi feito para o estado intermediário, assumindo-se neste caso a cisteína 50 como aquela que

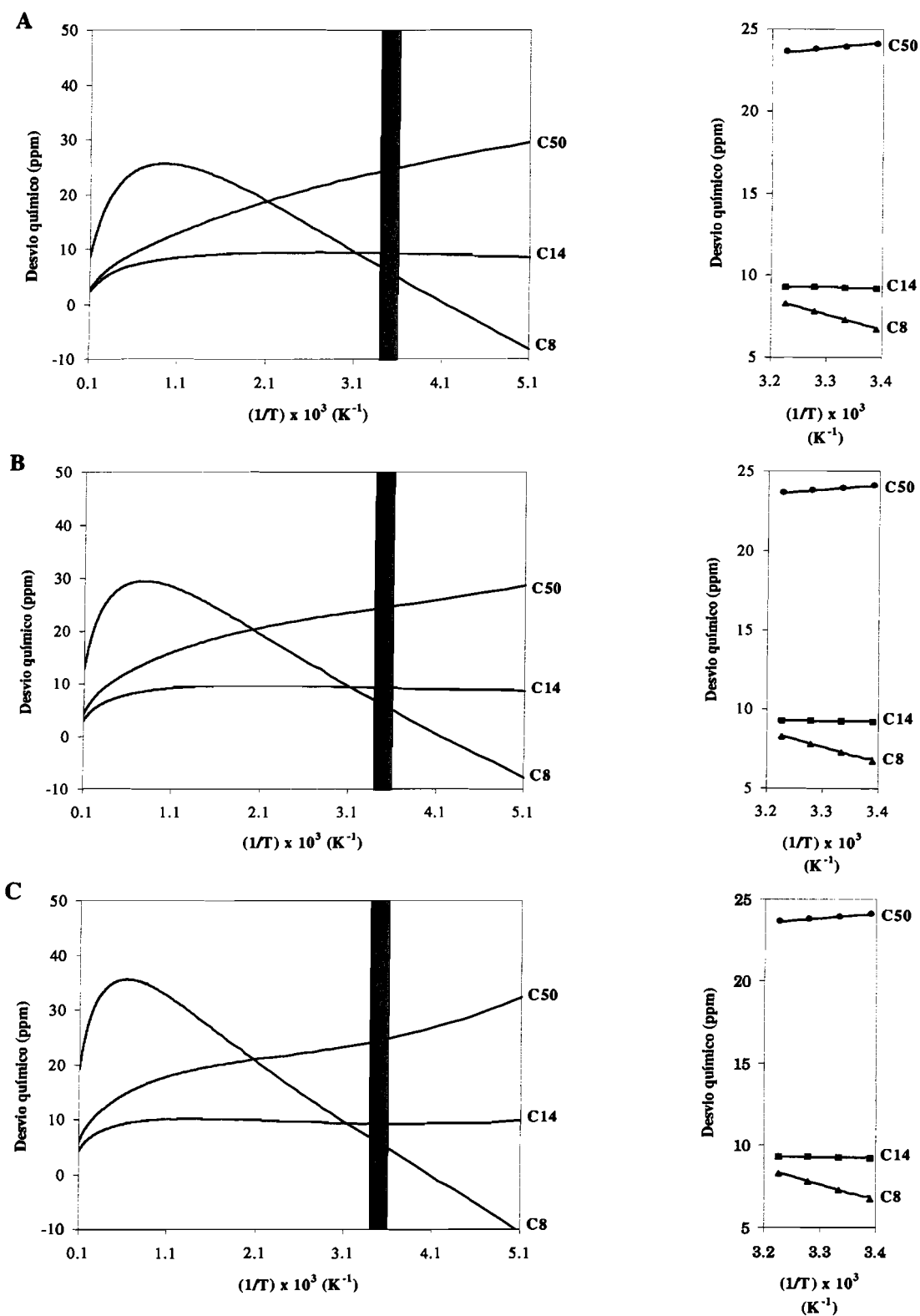


apresenta um comportamento diferente das outras, estando coordenada ao sítio Fe<sub>3</sub>. Tal como no caso anterior, uma tabela com os valores obtidos para as simulações realizadas é apresentada em IV.2.

**Tabela IV.2.** Valores obtidos para as variáveis consideradas no modelo de acoplamento de spins para o *DgFdII*<sub>ox</sub>, em três diferentes casos em que se consideram valores para as constantes de acoplamento da ordem dos 400, 300 e 200 cm<sup>-1</sup> respectivamente, e que representam o melhor ajuste à curva representativa dos valores de desvio químico dos prótons β-CH<sub>2</sub> das cisteínas 8, 14 e 50 e a sua dependência com a temperatura.

<i>DgFdII</i> <sub>ox</sub>			
	A	B	C
<b>J<sub>12</sub></b>	214	320	465
<b>J<sub>13</sub></b>	194	305	451
<b>J<sub>23</sub></b>	185	294	439
<b>A<sub>1</sub></b>	1.11	1.81	3.03
<b>A<sub>2</sub></b>	0.305	0.445	0.68
<b>A<sub>3</sub></b>	0.349	0.605	0.94
<b>ΔJ</b>	29	26	26
<b>ΔJ'</b>	20	15	14
<b>ΔJ''</b>	9	11	12





**Figura IV.3.** Curvas teóricas obtidas a partir do modelo da dependência com a temperatura do desvio químico das ressonâncias de contacto calculadas para os prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> coordenados ao centro [3Fe-4S] da *DgFdII*<sub>ox</sub>. A,B e C, representam os três casos referidos na Tabela IV.2. A cinza, encontra-se delimitada a gama de temperaturas da RMN, a qual pode ser observada com pormenor à direita em que se sobrepõem os valores experimentais obtido na gama de temperaturas da RMN (com os símbolos ●, ▲, ■) com as curvas teóricas.

As observações que podem ser feitas relativamente aos valores da Tabela IV.2. e das curvas teóricas para o estado oxidado são basicamente as mesmas, uma vez que não se observam grandes variações nem nos valores das variáveis, nem no tipo de andamento apresentado pelas curvas teóricas, isto tendo em conta que tentaram fazer-se as simulações nos dois casos para a mesma gama de valores de  $J_{12}$ ,  $J_{13}$  e  $J_{23}$ , de modo a ser possível comparar ambas as situações.

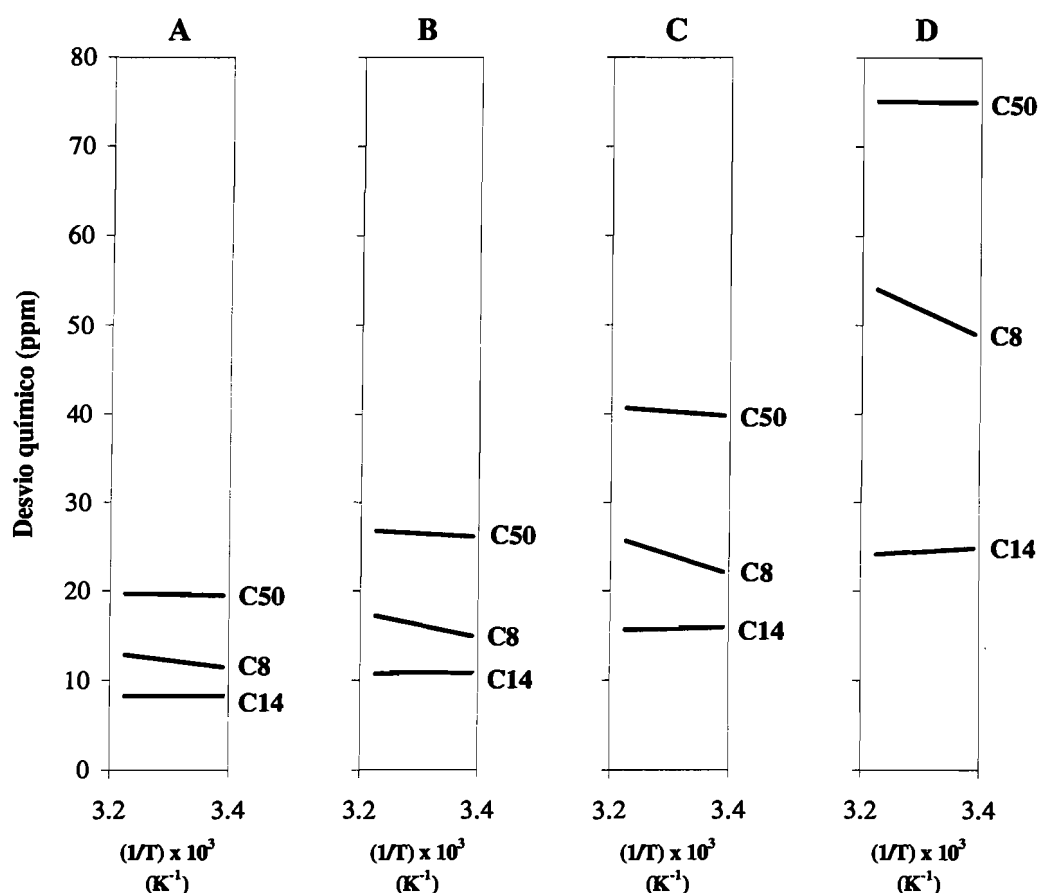
Existe no entanto uma diferença a considerar, que tem a ver com o valor de  $A_2$  e  $A_3$ . Enquanto que o valor de  $A_1$  praticamente não varia do estado oxidado para o intermediário, não esquecendo que para maiores valores de  $A$ , as mesmas diferenças vão tendo cada vez mais um efeito menos significativo no valor de desvio químico, não se podendo dizer o mesmo dos valores de  $A_2$  e  $A_3$ . O valor de  $A_2$  diminui para cerca de metade quando passamos do estado oxidado para o intermediário, enquanto que o valor de  $A_3$  aumenta na proporção inversa. Conjuntamente com esta observação, convém ainda lembrar que no estado oxidado é o sitio  $Fe_3$ , aquele que se apresenta diferente dos outros dois, enquanto que no estado intermediário esta diferença é apresentada pelo sitio  $Fe_2$ , estando os valores de  $A_3$  e  $A_2$  directamente relacionados com os prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas 50 e 14 coordenadas a  $Fe_3$  e  $Fe_2$  respectivamente.

#### IV.4. Estudo qualitativo do modelo de acoplamento de spins

De forma a entender de uma maneira mais clara o efeito de cada uma das variáveis tanto no valor de desvio químico das ressonâncias dos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas que coordenam o centro [3Fe-4S], como no declive da recta que relaciona para cada uma delas o

valor de desvio químico com o inverso da temperatura, foi feito um estudo qualitativo do modelo de acoplamento de spins apresentado neste capítulo. Fez-se deste modo variar cada uma das variáveis independentemente, mantendo todas as outras constantes. Os resultados são apresentados nas páginas seguintes sobre a forma de gráficos para cada um dos casos.

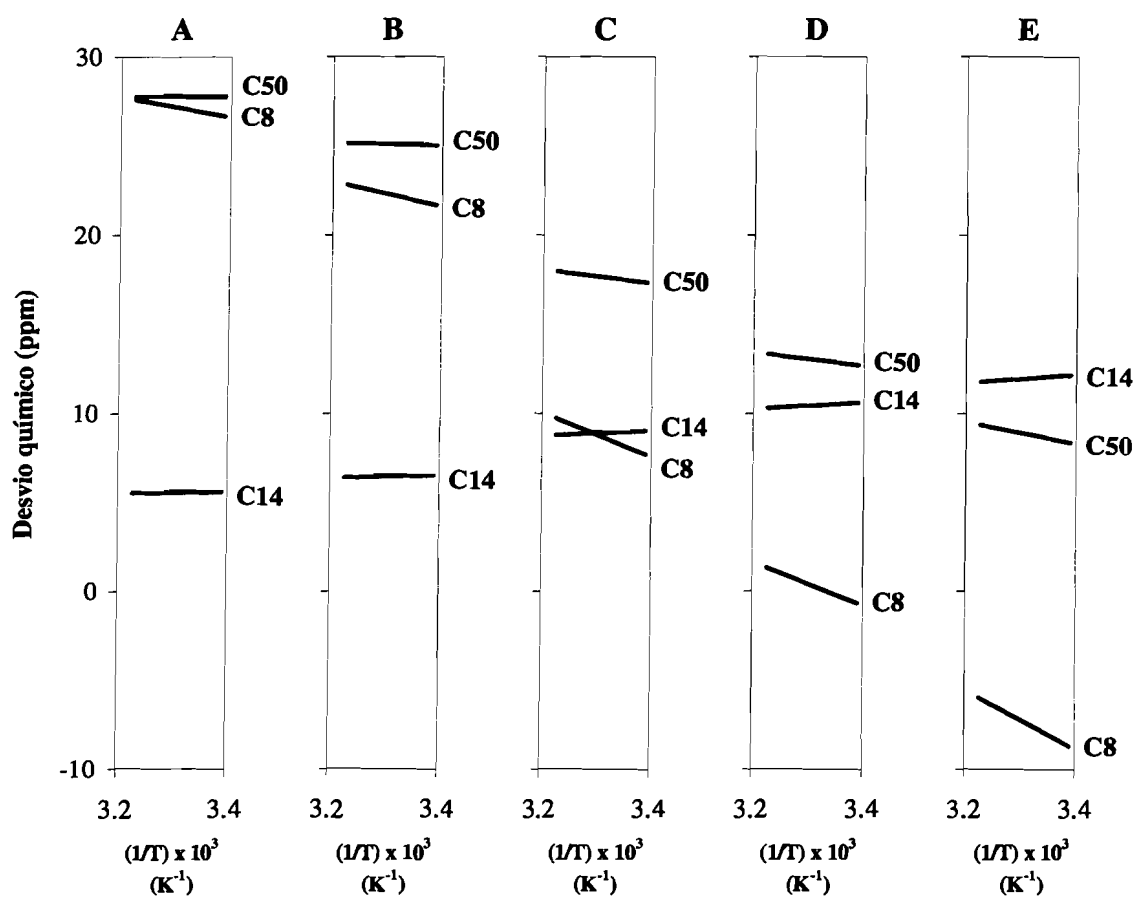
**1. Variação com o valor das constantes de acoplamento  $J_{12}$ ,  $J_{13}$  e  $J_{23}$ .**



**Figura IV.4.** Variação do valor do desvio químico e declive da recta que o relaciona com o inverso da temperatura para cada um dos pares de protões  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas 8,14 e 50, com o valor das constantes de acoplamento  $J_{12}$ ,  $J_{13}$  e  $J_{23}$ , para o modelo de acoplamento de spins gerado para a *DgFdII*<sub>int</sub>. Para todos os quatro casos,  $\Delta J=28$ ,  $\Delta J'=21$ ,  $\Delta J''=7$ ,  $A_1=3.34$ ,  $A_2=0.295$  e  $A_3=1.91$ . A ( $J_{12}=446$ ,  $J_{13}=467$  e  $J_{23}=439$ ), B ( $J_{12}=346$ ,  $J_{13}=367$  e  $J_{23}=339$ ), C ( $J_{12}=246$ ,  $J_{13}=267$  e  $J_{23}=239$ ) e D ( $J_{12}=146$ ,  $J_{13}=167$  e  $J_{23}=139$ ).

Observando a Figura IV.4., pode concluir-se que à medida que os valores das constantes de acoplamento  $J_{12}$ ,  $J_{13}$  e  $J_{23}$  diminuem, mantendo-se todas as outras variáveis constantes, aumentam tanto a diferença entre os valores de desvio químico para cada um dos pares de prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub>, como os declives das rectas que relacionam o desvio químico com o inverso da temperatura.

## 2. Variação com os valores de $\Delta J$ e $\Delta J'$ .



**Figura IV.5.** Variação do valor do desvio químico e declive da recta que o relaciona com o inverso da temperatura para cada um dos pares de prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas 8,14 e 50, com o valor de  $\Delta J$  e  $\Delta J'$ , para o modelo de acoplamento de spins gerado para a DgFdII<sub>int</sub>. Para todos os cinco casos,  $\Delta J''=7$ ,  $A_1=3.34$ ,  $A_2=0.295$  e  $A_3=1.91$ . A ( $\Delta J=12$ ,  $\Delta J'=5$ ), B ( $\Delta J=17$ ,  $\Delta J'=10$ ), C ( $\Delta J=32$ ,  $\Delta J'=25$ ), D ( $\Delta J=42$ ,  $\Delta J'=35$ ) e E ( $\Delta J=52$ ,  $\Delta J'=45$ ).

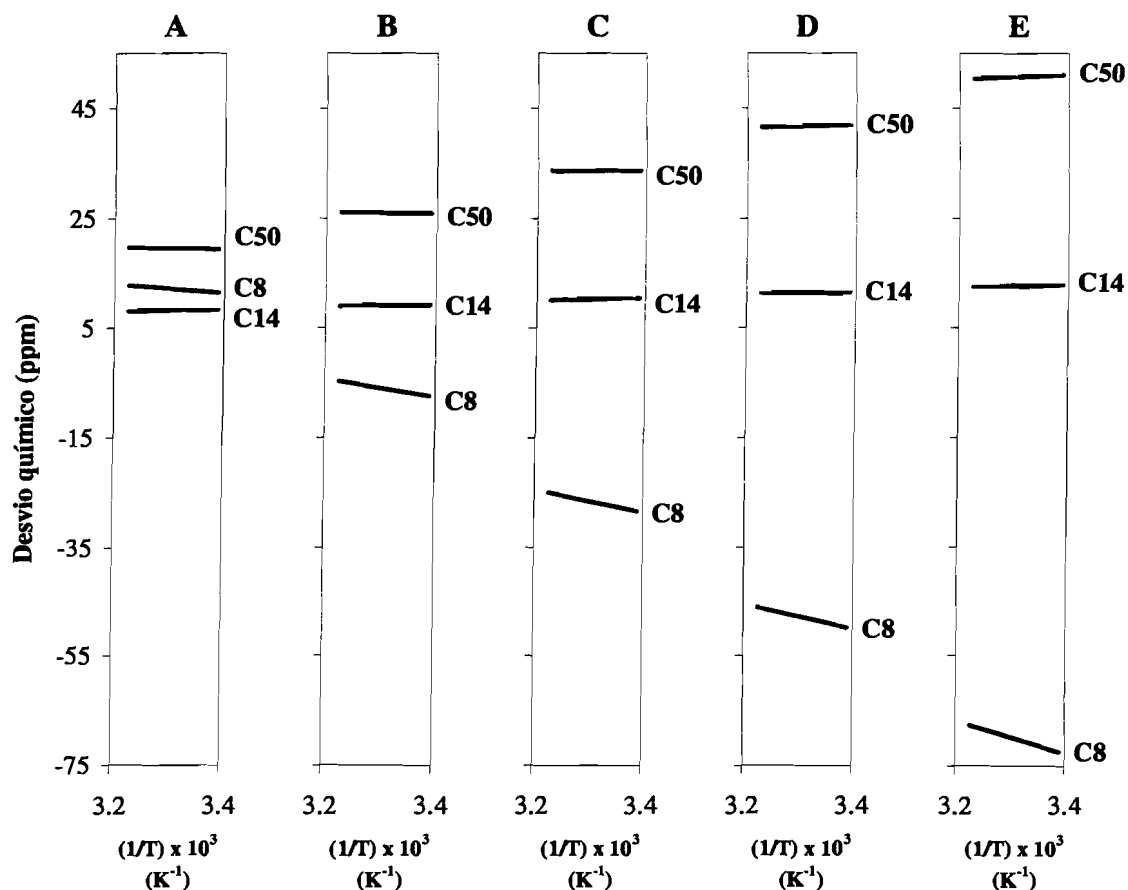
Observa-se pela Figura IV.5., que a medida que aumenta a diferença entre as constantes de acoplamento  $J_{13}$  (entre os sítios  $Fe_1$  e  $Fe_3$ ) e  $J_{12}$ ,  $J_{23}$  (entre os sítios  $Fe_1$  e  $Fe_2$  e  $Fe_3$  e  $Fe_2$ , respectivamente), aumenta grandemente a diferença entre os desvios químicos, tanto das ressonâncias entre as cisteínas coordenadas a  $Fe_1$  e  $Fe_3$ , como de cada uma destas em relação às ressonâncias da cisteína 14, coordenada ao  $Fe_2$ . Na realidade,  $Fe_2$  está a tornar-se cada vez mais diferenciado relativamente a  $Fe_1$  e  $Fe_3$ . Verifica-se ainda que no caso da cisteína coordenada ao  $Fe_2$ , esta mantém valores de desvio químicos bastante mais próximos uns dos outros de caso para caso, o que seria de esperar, dado que os valores das diferenças das constantes  $J_{12}$  e  $J_{23}$  se mantêm constantes em todos os casos.

### ***3. Variação com os valores de $\Delta J$ e $\Delta J''$ .***

Na Figura IV.6. pode observar-se o efeito qualitativo da variação dos valores de  $\Delta J$  e  $\Delta J''$  nos desvios químicos das ressonâncias dos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas coordenadas aos átomos de ferro 1,2 e 3.

Uma vez mais se verifica que as ressonâncias pertencentes às cisteínas 8 e 50 são as que apresentam uma maior variação tanto no valor do desvio químico como no declive da recta que o relaciona com o inverso da temperatura, sendo esta variação mais preponderante no caso da cisteína 8. A cisteína 14 é uma vez mais aquela cujos desvios químicos das ressonâncias apresentam uma maior homogeneidade, tanto ao nível do seu valor intrínseco, como do declive da recta que reflecte o seu comportamento com a temperatura.

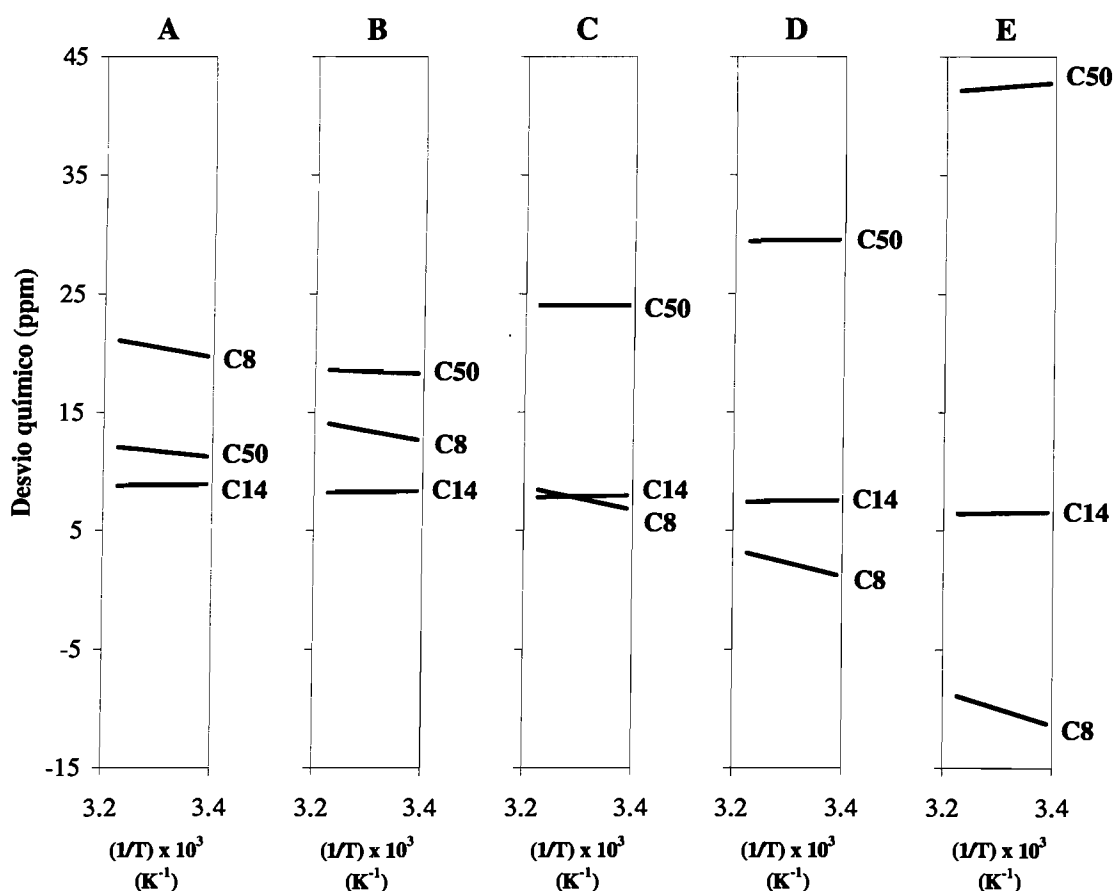
É ainda de notar que à medida que diminuí o valor da constante de acoplamento  $J_{23}$ , aumentando a sua diferença relativamente a  $J_{12}$  e  $J_{13}$ , torna-se maior a disparidade de valores entre os desvios químicos dos três pares de ressonâncias das cisteínas 8, 14 e 50.



**Figura IV.6.** Variação do valor do desvio químico e declive da recta que o relaciona com o inverso da temperatura para cada um dos pares de prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas 8,14 e 50, com o valor de  $\Delta J$  e  $\Delta J'$ , para o modelo de acoplamento de spins gerado para a DgFdII<sub>int</sub>. Para todos os cinco casos,  $\Delta J''=21$ ,  $A_1=3.34$ ,  $A_2=0.295$  e  $A_3=1.91$ . A ( $\Delta J=28$ ,  $\Delta J'=7$ ), B ( $\Delta J=37$ ,  $\Delta J'=16$ ), C ( $\Delta J=47$ ,  $\Delta J'=26$ ), D ( $\Delta J=57$ ,  $\Delta J'=36$ ) e E ( $\Delta J=67$ ,  $\Delta J'=46$ ).

#### 4. Variação com os valores de $\Delta J'$ e $\Delta J''$ .

As observações que podem ser feitas relativamente ao estudo apresentado na Figura IV.7. são sensivelmente as mesmas que foram feitas em 3, com a diferença que neste caso, tanto as ressonâncias pertencentes à cisteína 8 como à cisteína 50 apresentam ambas uma variação no valor do desvio químico da mesma ordem de grandeza.

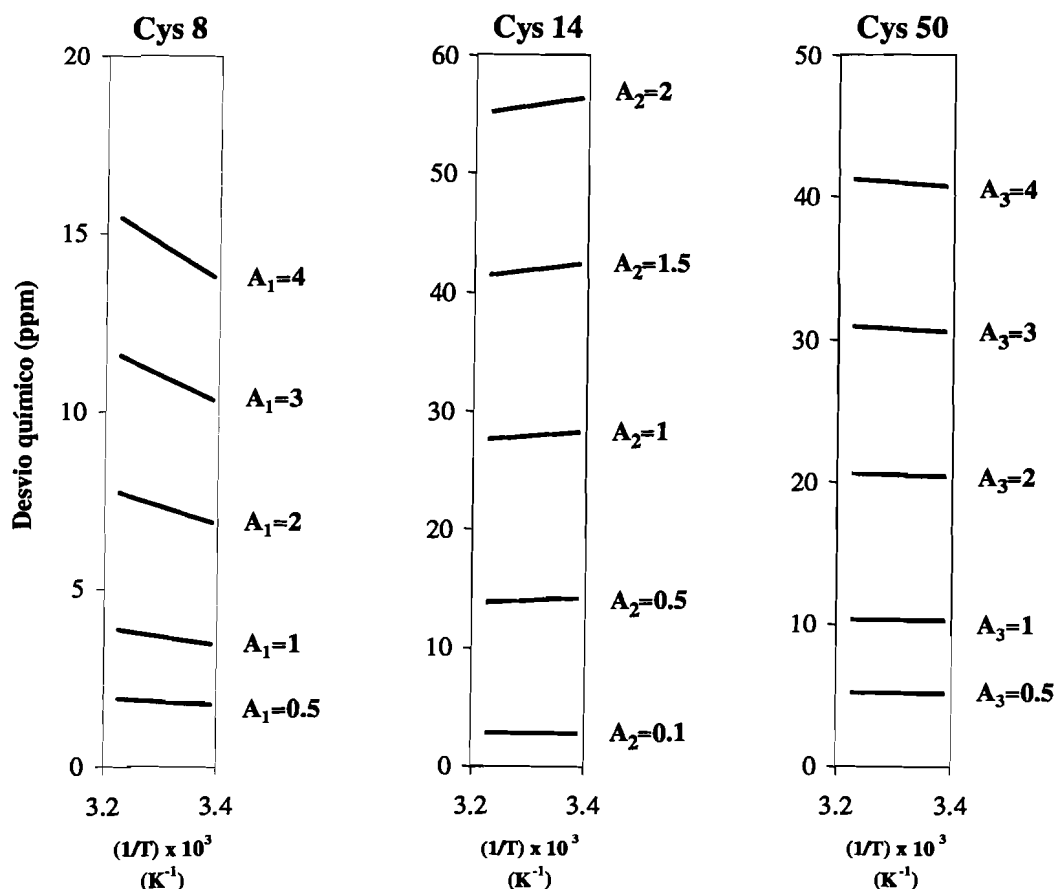


**Figura IV.7.** Variação do valor do desvio químico e declive da recta que o relaciona com o inverso da temperatura para cada um dos pares de prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas 8,14 e 50, com o valor de  $\Delta J'$  e  $\Delta J''$ , para o modelo de acoplamento de spins gerado para a DgFdII<sub>int</sub>. Para todos os cinco casos,  $\Delta J=28$ ,  $A_1=3.34$ ,  $A_2=0.295$  e  $A_3=1.91$ . A ( $\Delta J'=28$ ,  $\Delta J''=0$ ), B ( $\Delta J'=22$ ,  $\Delta J''=6$ ), C ( $\Delta J'=17$ ,  $\Delta J''=11$ ), D ( $\Delta J'=12$ ,  $\Delta J''=16$ ) e E ( $\Delta J'=0$ ,  $\Delta J''=28$ ).

### 5. Variação com o valor de A.

A Figura IV.8. representa uma previsão da variação do comportamento do desvio químico com a temperatura para cada um dos pares das ressonâncias pertencentes aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> dos resíduos cisteicos que coordenam o agregado [3Fe-4S], com o valor de A. Facilmente pode concluir-se que em todos os casos, à medida que aumenta o valor da

constante de acoplamento de spin nuclear  $A$ , os valores de desvio químico aumentam. Pode também observar-se que com o aumento do valor de  $A$ , no caso das cisteínas 8 e 50 (dependência do desvio químico com a temperatura do tipo *anti-Curie*), o declive da recta que relaciona o desvio químico com o inverso da temperatura, torna-se cada vez mais negativo, enquanto que para a cisteína 14, que apresenta um tipo de dependência com a temperatura do tipo *Curie*, este declive torna-se inversamente cada vez mais positivo.



**Figura IV.8.** Variação do valor do desvio químico e declive da recta que o relaciona com o inverso da temperatura para cada um dos pares de prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas 8,14 e 50, com o valor de  $A$ , para o modelo de acoplamento de spins gerado para a DgFdII<sub>int</sub>. Em todos os três casos  $J_{12}=446$ ,  $J_{13}=467$  e  $J_{23}=439$ . Os dois valores de  $A$ , não referenciados em cada um dos casos mantêm-se constantes e iguais a  $A_1=3.34$ ,  $A_2=0.295$  e  $A_3=1.91$ .



Uma outra observação, que não deixa de ser interessante, reside no facto da variação do valor de desvio químico com o valor de  $A$ , ser significativamente mais acentuada para o caso da cisteína 14, seguindo-se a cisteína 50 e por fim a cisteína 8.

#### IV.5. Conclusões

O desenvolvimento de um modelo capaz de traduzir o comportamento do desvio químico das ressonâncias dos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas 8,14 e 50 para o estado intermediário da *DgFdII*, levou a que fosse criado um modelo, para o qual, além de se poderem considerar três constantes de acoplamento  $J_{12}$ ,  $J_{13}$  e  $J_{23}$  diferentes, podem também considerar-se valores para a constante de acoplamento de spin nuclear  $A$ , individualizadas para cada um dos sítios  $Fe_1$ ,  $Fe_2$  e  $Fe_3$ , dando origem a diferentes valores para  $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$ , e a um total de seis variáveis a otimizar. As simulações feitas revelam a impossibilidade de determinação de um só valor para as constantes de acoplamento, uma vez que variando os valores de  $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$ , consegue-se traduzir de forma idêntica para todos os casos, o tipo de comportamento dos três pares de ressonâncias revelado por RMN, dando origem a pelo menos três situações (não foram tentadas simulações com valores de  $J$  acima dos valores da situação C) com valores de  $J$  por volta dos 210 cm<sup>-1</sup> (situação A), 320 cm<sup>-1</sup> (situação B) e 450 cm<sup>-1</sup> (situação C) e diferentes valores de  $A$ . Houve também uma tentativa de simular uma situação com valores de  $J$  rondando os 100 cm<sup>-1</sup>, revelando-se no entanto impossível de simular tal situação. Tal facto deve-se possivelmente ao facto de que para valores de  $J$  dessa ordem, as ressonâncias atribuídas aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas coordenantes 8, 14 e 50, apresentam valores de desvio químico bastante acima dos valores obtidos experimentalmente

(ver Figura IV.4.), em que mesmo uma diminuição dos valores da constante  $A$ , nomeadamente  $A_1$  para a cisteína 8, a qual apresenta um declive bastante negativo, não deverá ser suficiente para fazer coincidir os valores simulados com os valores experimentais.

Uma outra observação pertinente que pode ser retirada deste estudo, reside no facto da cisteína 14 apresentar uma dependência muito menor do que as outras duas cisteínas 8 e 50, a qualquer variação introduzida nas variáveis  $J$ ,  $A$  e  $\Delta J$ , apresentando sempre um comportamento muito mais homogéneo, revelador talvez de uma maior rigidez na sua estrutura, uma vez que uma pequena mudança nos valores de desvio químico é também forçosamente provocada por uma pequena mudança nos valores dos ângulos diedros  $\text{Fe-S}\gamma\text{-C}\beta\text{-C}\alpha$ . Curioso será ainda relembrar que esta mesma cisteína 14 apresenta uma mudança no valor deste mesmo ângulo diedro na passagem do estado oxidado para o estado intermediário de apenas  $6^\circ$  (ver Tabela III.2.), bastante inferior à diferença apresentada pelas cisteínas 8 e 50.

Face aos resultados, torna-se evidente a necessidade de recorrer a outras técnicas experimentais, nomeadamente as espectroscopias *HYSCORE* ou *ENDOR*, que se revelam capazes de determinar valores de constantes de acoplamento de spin nuclear,  $A$ , para centros metálicos, de forma a ser encontrada uma só solução e determinar-se com uma maior certeza os valores de  $J$  que caracterizam o acoplamento entre os átomos de ferro para o estado intermediário da *DgFdII*. Este processo encontra-se de momento em estudo, sendo necessário uma amostra de *DgFdII*<sub>int</sub> rica em  $^{57}\text{Fe}$ , indispensável para a espectroscopia de *ENDOR*.

## IV.6. Bibliografia

1. Kent, T. A., Huynh, B. H., and Münck, E. (1980) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **77**, 6574
2. Fukuyama, K., Hase, T., Matsumoto, S., Tsukihara, T., Katsube, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Wada, K., and Matsubara, H. (1980) *Nature* **286**, 522
3. Emptage, M. H., Kent, T. A., Huynh, B. H., Rawlings, J., Orme-Johnson, W. H., and Münck, E. (1980) *J.Biol.Chem.* **255**, 1793-1796
4. Werth, M. T., Kurtz Jr, D. M., Moura, I., and LeGall, J. (1987) *J.Am.Chem.Soc.* **109**, 273
5. Gayda, J. P., Bertrand, P., Theodule, F. X., and Moura, J. J. G. (1982) *J.Chem.Phys.* **77**, 3387-3391
6. Guigliarelli, B., Gayda, J. P., Bertrand, P., and More, C. (1986) *Biochim.Biophys.Acta* **871**, 149-155
7. Guigliarelli, B., More, C., Bertrand, P., and Gayda, J. P. (1986) *J.Chem.Phys.* **85**, 2774-2778
8. Day, E. P., Peterson, J., Bonvoisin, J. J., Moura, I., and Moura, J. J. G. (1988) *J.Biol.Chem.* **263**, 3684
9. Macedo, A. L., Moura, I., LeGall, J., Huynh, B., and Moura, J. J. G. (1993) *Inorganic Chemistry* **32**, 1101-1105

## **CAPÍTULO V**

### **O centro heterometálico [Co, 3Fe-4S]**

## **O centro heterometálico [Co, 3Fe-4S]**

V.1. Objectivo	129
V.2. Introdução	129
V.3. Materiais e métodos	131
V.4. Caracterização espectroscópica do centro [Co, 3Fe-4S]	132
V.4.1. Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)	132
V.4.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	134
V.5. Conclusões	139
V.6. Bibliografia	141

## V.1. Objectivo







Neste capítulo é sintetizado o agregado heterometálico [Co,3Fe-4S], pelo método descrito por Moura e colaboradores [1], utilizando a *DgFdII* como composto de partida, no processo de síntese. Foi ainda realizada uma breve caracterização espectroscópica do mesmo, através das técnicas espectroscópicas de RPE e RMN.

## V.2. Introdução

Como já foi referido no capítulo I, os processos de interconversão na *DgFdII* foram já sujeitos a estudos exaustivos, e permitem a obtenção de agregados heterometálicos do tipo [M,3Fe-4S], com M= Co, Zn, Cd, Ga e Ni [2-4], de um modo bastante simples. Dado apresentarem diferentes estados de spin e provavelmente diferentes distribuições electrónicas nos centros activos, estes agregados conferem pois, novas propriedades às ferredoxinas, podendo torná-las compostos modelo de centros heterometálicos presentes em certos sistemas enzimáticos.

A incorporação de  $\text{Co}^{+2}$  ( $S=3/2$ ) coordenado ao resíduo cisteico Cys 11, vago na *DgFdII*, dá origem a um agregado  $[\text{Co}, 3\text{Fe}-4\text{S}]^{+2}$ , constituído por um par de valência misto e um sítio  $\text{Fe}^{+3}$  (Tabela V.1.), tal como sugerido por estudos de Mössbauer [2], com  $S=1/2$  e activo em RPE, com um sinal semelhante a um centro  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{+1}$ , mas com desdobramentos hiperfinos resultantes da presença de um átomo de cobalto com momento nuclear  $I=7/2$ . O estado reduzido  $[\text{Co}, 3\text{Fe}-4\text{S}]^{+1}$ , obtido por adição de um electrão ao  $\text{Fe}^{+3}$  do estado oxidado ( $E^\circ=-220\text{mV}$ ), apresenta espectros de Mössbauer e de MCD característicos de sistemas com spin inteiro,  $S>0$ , provavelmente  $S=1$  [5,6].

**Tabela V.I.** Desvios isoméricos e desdobramentos de quadrupolo dos três sítios Fe em diferentes agregados que possuem agregados de valência mista (retirada de [7]).

Agregado	Valências formais	$\delta$ mm/s	$\Delta E_Q$ mm/s	# Fe	Spin
[3Fe-4S] <sup>0</sup>		0.46	1.47	2	S=2
	 Fe <sup>+3</sup>	0.32	0.52	1	
[4Fe-4S] <sup>+2</sup>		0.45	1.32	2	S=0
	 Fe <sup>+3</sup> -Fe <sup>+2</sup>	0.45	1.32	1	
		0.41	0.55	1	
[Co,3Fe-4S] <sup>+2</sup>		0.44	1.35	2	S=1/2
	 Fe <sup>+3</sup> -Co <sup>+2</sup>	0.35	1.1	1	
[4Fe-4S] <sup>+1</sup>		0.51	1.07	2	S=1/2
	 <span style="border: 1px solid black;">Fe<sup>+2</sup></span> -Fe <sup>+2</sup>	0.60	1.67	2	
[Zn,3Fe-4S] <sup>+1</sup>		0.52	1.5	1	S=5/2
			1.7	1	
	<span style="border: 1px solid black;">Fe<sup>+2</sup></span> -Zn <sup>+2</sup>	0.62	2.7	1	
[Co,3Fe-4S] <sup>+1</sup>		0.53	1.28	2	S>0 (int)
	 <span style="border: 1px solid black;">Fe<sup>+2</sup></span> -Co <sup>+2</sup>	0.53	1.28	1	

Na Tabela V.I. pode observar-se que o agregado [Co, 3Fe-4S], possui em ambos os estados de oxidação formal, desvios isoméricos característicos de agregados com um par de valência mista, tal como sucede para o agregado [3Fe-4S]<sup>0</sup>, ou ainda em várias HiPIPs. Será pois de esperar, e atendendo aos estudos já realizados por Ressonância Magnética Nuclear para o estado reduzido da DgFdII [8], ou por exemplo para a HiPIP I de *Ectothiorhodospira*

*halophila* [9], que este agregado heterometálico de cobalto dê origem a espectros de RMN de próton de 1D com ressonâncias desviadas para campo alto. Não deixa ainda de ser curioso observar que o processo de redução com um electrão para cada um dos agregados representados, localiza o electrão extra, tanto no caso dos agregados homonucleares como dos heteronucleares, no átomo de ferro não pertencente ao par de valência mista. Assim, verifica-se que para  $[4\text{Fe-4S}]^{+1}$ ,  $[\text{Co}, 3\text{Fe-4S}]^{+1}$  e  $[\text{Zn}, 3\text{Fe-4S}]^{+1}$  o terceiro sítio Fe é formalmente  $\text{Fe}^{+2}$ . Em  $[4\text{Fe-4S}]^{+1}$  os dois Fe do par  $\text{Fe}^{+2}\text{-Fe}^{+2}$  exibem menos características de  $\text{Fe}^{+2}$ , traduzido pelo decréscimo do valor de  $\Delta E_Q$  relativamente aos complexos ferrosos  $[4\text{Fe-4S}]$ . Parece ocorrer alguma deslocalização do par  $\text{Fe}^{+2}\text{-Fe}^{+2}$  para o par  $\text{Fe}^{+2}\text{-Fe}^{+3}$ , ao observar-se um acréscimo do valor de  $\delta$  para o par  $\text{Fe}^{+2}\text{-Fe}^{+3}$ . Isto sugere que um modelo de acoplamento de spin para o agregado  $[4\text{Fe-4S}]^{+1}$  deverá incluir um termo de "double exchange", ligando o par  $\text{Fe}^{+2}\text{-Fe}^{+3}$  aos dois sítios ferrosos remanescentes.

Os resultados obtidos, resumidos na Tabela V.I., demonstram que a combinação da informação obtida para os agregados heterometálicos conjuntamente com os modelos de acoplamento de spin para dímeros de valência de deslocalização mista que têm em conta a teoria de "double exchange", poderão antecipar resultados no que se refere à estrutura electrónica de muitos agregados de interesse em Biologia.

### V.3. Materiais e métodos

As amostras de *DgFdII* foram purificadas de acordo com a técnica e materiais referidos na secção III.3. O composto  $[\text{Co}, 3\text{Fe-4S}]$  foi sintetizado de acordo com o método descrito na bibliografia [1]. As concentrações de proteína contendo o centro  $[\text{Co}, 3\text{Fe-4S}]$  foram calculadas com  $\epsilon_{405\text{nm}} = 16000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .



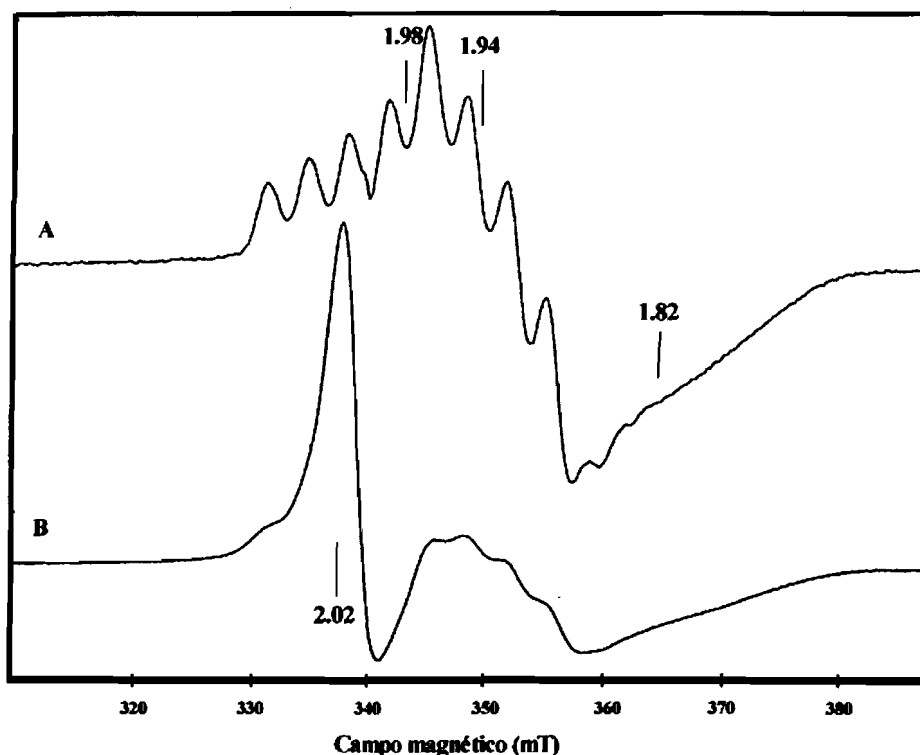
Os espectros de RPE foram adquiridos num aparelho Bruker EMX 8/2.7, equipado com um crióstato de fluxo contínuo da Oxford Instruments. As amostras de [Co,3Fe-4S] foram preparadas com uma concentração de 100 $\mu$ M, em tampão fosfatos 100mM, pH 8.0. A redução das mesmas foi feita por adição de ditionito de sódio.

Os espectros de RMN de próton foram obtidos em espectrómetros Bruker ARX de 400MHz, equipados com uma unidade de controlo de temperatura. Os valores de desvio químico são definidos em partes por milhão (ppm) relativamente ao 3-trimetilsilil-(2,2,3,3- $^2$ H<sub>4</sub>) propionato. Os valores positivos referem-se a desvios para campo baixo. As amostras de [Co,3Fe-4S] foram preparadas a uma concentração final de 1mM no tubo de RMN, sendo previamente equilibradas com tampão fosfatos 100mM, pH 8.0 e permutadas com 99.9% de  $^2$ H<sub>2</sub>O em centrífugas Amicon com membranas de 5kDa e posteriormente sob fluxo de N<sub>2</sub>.

#### **V.4. Caracterização espectroscópica do centro [Co, 3Fe-4S]**

##### ***V.4.1. Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)***

Foram realizados estudos de RPE da amostra de proteína contendo o centro [Co,3Fe-4S], nos estados oxidado e reduzido, sendo os resultados idênticos aos já publicados anteriormente [2], que apontam no sentido do Co ter sido incorporado no sítio livre do agregado [3Fe-4S].



**Figura V.1.** Espectro de EPR do centro [Co,3Fe-4S] no estado oxidado. A – T=40K B – T=12K.

Os espectros foram adquiridos com uma amplitude de modulação de 0.5mT e potência de 2mW.

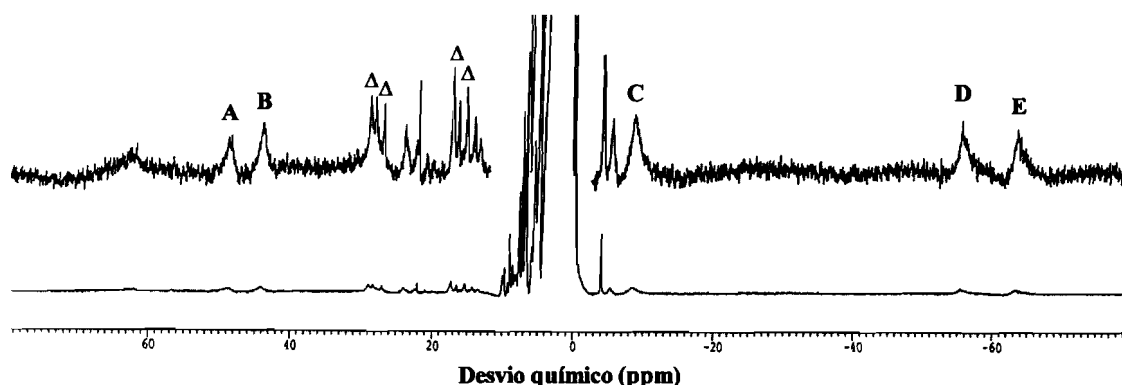
No estado oxidado, a amostra é activa em RPE, sendo os espectros às temperaturas de 12K e 40K apresentados na Figura V.1.. No estado reduzido, a amostra é silenciosa em RPE, não apresentando pois sinais de proteína contendo um centro  $[4\text{Fe-4S}]^{+1}$ , com  $S=1/2$ .

O espectro A da Figura V.1., apresenta oito linhas características de desdobramento hiperfino devido à presença do núcleo  $^{59}\text{Co}$  ( $I=7/2$ ). O espectro foi simulado, permitindo derivar os valores de g associados a um sinal rômico ( $g_x \approx 1.82$ ,  $g_y \approx 1.94$  e  $g_z = 1.98$ ). Este espectro apresenta sinais idênticos aos sinais "g=1.94" apresentados pelos agregados  $[4\text{Fe-4S}]$

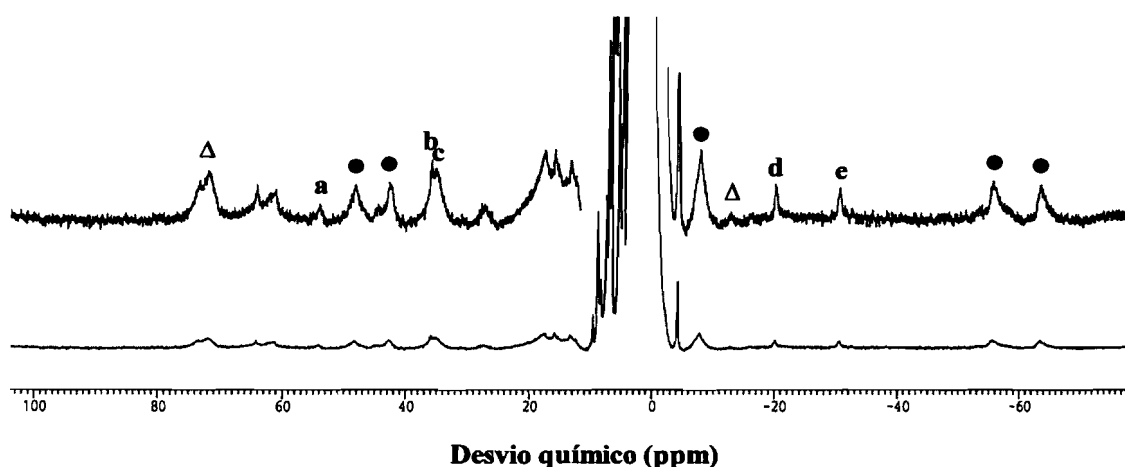
no estado reduzido [10]. Na Figura V.1-B a uma temperatura de 12 K, obtém-se um sinal do agregado [Co,3Fe-4S] parcialmente saturado. O sinal a  $g=2.02$ , pertence aos centros [3Fe-4S] não convertidos [11]. Pode-se assim, através do espectro de RPE estimar a taxa de conversão [3Fe-4S]  $\rightarrow$  [Co,3Fe-4S]. Utilizando como padrão uma amostra de  $DgFdII_{nat}$ , estimou-se uma taxa de conversão de cerca de 80%.

#### ***V.4.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)***

O interesse do estudo deste tipo de agregados em ferredoxinas, utilizando a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), deve-se como já foi referido anteriormente à possibilidade desta técnica na obtenção de informação que traduz o magnetismo, neste caso paramagnetismo, apresentado pelo centro heterometálico, através da análise das ressonâncias situadas no envelope paramagnético dos espectros de RMN dos estados oxidado e reduzido do agregado [Co, 3Fe-4S]. Atendendo a que a taxa de conversão do agregado [3Fe-4S] em [Co, 3Fe-4S] não é de 100%, é pois de esperar que se obtenham ressonâncias pertencentes aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> dos resíduos cisteicos para ambos os agregados. Os espectros de RMN de próton de ambos os estados de oxidação, bem como as dependências com a temperatura das ressonâncias situadas fora do envelope diamagnético dos mesmos, são apresentados nas Figuras V.2, V.3, V.4 e V.5.



**Figura V.2.** Espectro completo de RMN de prótão (com supressão do pico da água) no estado oxidado, a 400MHz e 300K, da *DgFdII* contendo o agregado  $[\text{Co}, 3\text{Fe}-4\text{S}]^{+2}$ . As ressonâncias pertencentes aos prótons próximos do centro paramagnético situadas nas regiões a campo baixo e campo alto, encontram-se marcadas. As ressonâncias A,B,C,D e E pertencem ao agregado  $[\text{Co}, 3\text{Fe}-4\text{S}]^{+2}$ , e as ressonâncias assinaladas com  $\Delta$  pertencem à espécie *DgFdII*<sub>ox</sub>.



**Figura V.3.** Espectro completo de RMN de prótão (com supressão do pico da água), a 400MHz e 300K, por adição de ditionito de sódio à *DgFdII* contendo o agregado  $[\text{Co}, 3\text{Fe}-4\text{S}]^{+1}$ . As ressonâncias pertencentes aos prótons próximos do centro paramagnético situadas nas regiões a campo baixo e campo alto, encontram-se marcadas. As ressonâncias a,b,c,d e e pertencem ao agregado  $[\text{Co}, 3\text{Fe}-4\text{S}]^{+1}$ , enquanto que as ressonâncias assinaladas com • pertencem ao agregado  $[\text{Co}, 3\text{Fe}-4\text{S}]^{+2}$  e as ressonâncias assinaladas com  $\Delta$  pertencem à espécie *DgFdII*<sub>red</sub>.

Observando os espectros de RMN, imediatamente se verifica a existência de ressonâncias desviadas para campo alto, normalmente observadas em proteínas com agregados [Fe-S], que apresentam pares de valência mista, como já foi referido anteriormente na secção V.2.

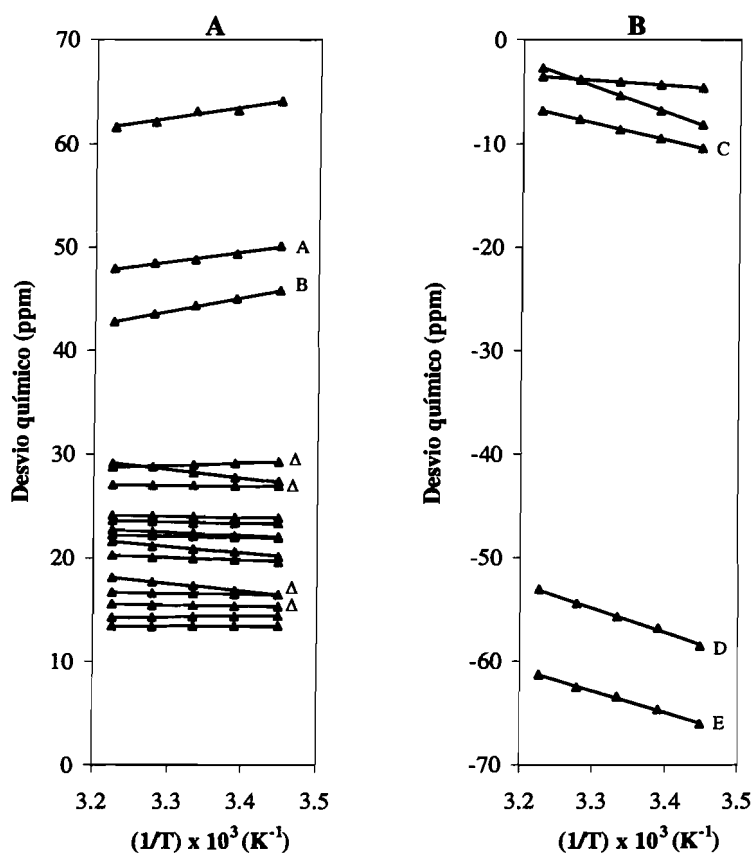
É interessante verificar que as ressonâncias do estado reduzido (Figura V.3.) aparecem muito mais desviadas para campo baixo, relativamente aos sinais obtidos para a  $DgFdII_{ox}$  ( $S=1/2$ ), verificando-se também para ambos os casos, a existência de ressonâncias desviadas para campo alto, detectadas também para a  $DgFdII_{red}$  ( $S=2$ ) [8].

As ressonâncias dos prótons próximos do centro paramagnético, situadas fora do envelope diamagnético do espectro de RMN, podem ser caracterizadas em ambos os estados oxidado e reduzido, por elevadas larguras de linha ( $\approx 150 - 800$  Hz) e tempos de relaxação muito curtos, da ordem dos 1 – 4ms. Sabendo que cerca de 20% do total da amostra é  $FdII$ , torna-se necessária uma análise mais detalhada das ressonâncias, recorrendo aos valores de desvio químico e comportamento com a temperatura, de forma a ser possível a sua atribuição a cada um dos agregados presentes.

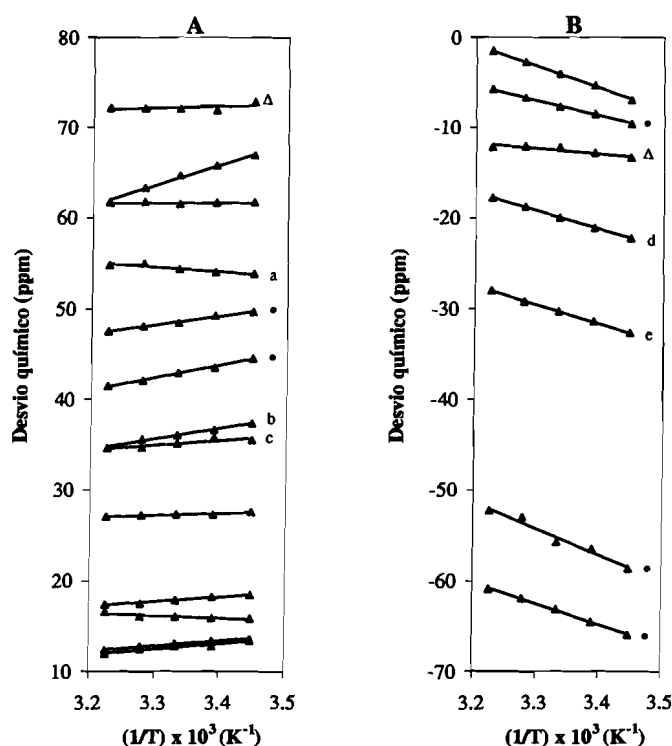
A dependência com a temperatura do desvio químico das ressonâncias situadas na região paramagnética do espectro de RMN, é apresentada nas Figura V.4. para o estado oxidado da  $DgFdII$  contendo o centro  $[Co,3Fe-4S]^{+2}$ , e na Figura V.5. para o estado reduzido da mesma. Ambos os estados apresentam uma mistura de comportamentos *Curie* e *anti-Curie*, em que para as ressonâncias desviadas para campo alto (Figuras V.4.B e V.5.B) se observa uma dependência uniforme do tipo *anti-Curie*.

Relativamente à Figura V.2. representativa do estado oxidado do agregado heterometálico e por comparação conjunta com os espectros do estado oxidado da  $DgFdII$  e das respectivas dependências com a temperatura das ressonâncias pertencentes aos prótons  $\beta-CH_2$  dos resíduos cisteicos (ver secção III.4.1), podem atribuir-se as

ressonâncias assinaladas com  $\Delta$  na Figura V.2. a ambos os prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> da cisteína 50, a um dos mesmos prótons da cisteína 8 e a outro da cisteína 14, na *DgFdII*<sub>ox</sub>. No que respeita às ressonâncias A,B,C,D e E, e por comparação com o espectro da Figura V.3. obtido por adição de ditionito de sódio à solução que contém o agregado [Co, 3Fe-4S]<sup>+2</sup>, podem-se atribuir estas ressonâncias aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das cisteínas coordenantes no agregado heterometálico no estado oxidado. Verifica-se que estas mesmas ressonâncias se mantêm no espectro da Figura V.3. o que indica que a amostra não se encontra totalmente reduzida. As restantes ressonâncias não assinaladas na Figura V.2. deverão certamente pertencer a prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> dos resíduos cisteicos que coordenam o agregado heterometálico, partindo do princípio que existem em solução somente as duas espécies já referidas.



**Figura V.4.** Dependência de temperatura dos sinais a campo baixo (A) e campo alto (B), obtidos por RMN de próton (Figura V.2.), para o estado oxidado da *DgFdII* contendo o centro [Co,3Fe-4S]<sup>+2</sup>. As ressonâncias A,B,C,D e E pertencem ao agregado [Co, 3Fe-4S]<sup>+2</sup>, e as ressonâncias assinaladas com  $\Delta$  pertencem à espécie *DgFdII*<sub>ox</sub>.



**Figura V.5.** Dependência de temperatura dos sinais a campo baixo (A) e campo alto (B), obtidos por RMN de próton (Figura V.3.), por adição de ditionito de sódio à  $DgFdII$  contendo o centro  $[Co, 3Fe-4S]^{+1}$ . As ressonâncias **a, b, c, d** e **e** pertencem ao agregado  $[Co, 3Fe-4S]^{+1}$ , enquanto que as ressonâncias assinaladas com  $\bullet$  pertencem ao agregado  $[Co, 3Fe-4S]^{+2}$  e as ressonâncias assinaladas com  $\Delta$  pertencem à espécie  $DgFdII_{red}$ .

Em relação ao espectro da Figura V.3., parece assim estarem presentes três espécies;  $[Co, 3Fe-4S]^{+2}$ ,  $[Co, 3Fe-4S]^{+1}$  e  $[3Fe-4S]^0$ . Este facto não é de estranhar, atendendo aos potenciais de redução de cada uma das espécies. O agregado de 3Fe possui um potencial de redução de cerca  $E^0 = -130$  mV [12], enquanto que o potencial do agregado heterometálico é de  $-245$  mV [6]. Será pois aceitável que no caso de uma redução incompleta de todas as espécies presentes em solução, como sucede neste caso, em que se obtém o agregado de 3Fe completamente reduzido, enquanto que o agregado de cobalto encontra-se em solução nos dois estados de oxidação +2 e +1. As ressonâncias assinaladas com  $\Delta$  apresentam valores de desvio químico característicos da  $DgFdII_{red}$  [8], podendo ser atribuídas a prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> de

resíduos cisteicos em  $[3\text{Fe-4S}]^0$ . As ressonâncias assinaladas com • são as mesmas que A,B,C,D e E na Figura V.2 respectivamente, correspondendo assim ao agregado  $[\text{Co}, 3\text{Fe-4S}]^{+2}$ , sendo as ressonâncias a, b, c, d e e pertencentes aos prótons  $\beta\text{-CH}_2$  das cisteínas que coordenam o agregado  $[\text{Co}, 3\text{Fe-4S}]^{+1}$ , uma vez que no espectro na Figura V.2. não existem quaisquer ressonâncias aos valores de ppm a que estas se encontram na Figura V.3. Em relação às restantes ressonâncias é talvez um pouco prematuro a sua atribuição, dado coexistirem na mesma região espectral com outras ressonâncias presentes na Figura V.2.

Foram também realizados vários estudos utilizando técnicas de NOE 1D e NOESY 2D, de forma a tentar obter correlações entre os prótons  $\beta\text{-CH}_2$  e  $\alpha\text{-CH}$ , pertencentes aos resíduos cisteicos que coordenam o agregado  $[\text{Co}, 3\text{Fe-4S}]$ . Não se conseguiu no entanto obter efeito nas ressonâncias por irradiação dos picos pertencentes aos prótons  $\beta\text{-CH}_2$  das cisteínas que coordenam o agregado heterometálico, através de experiências de NOE 1D, nem picos cruzados nos espectros de NOESY 2D.

## V.5. Conclusões

A análise dos espectros de RPE sugere a formação de um agregado misto  $[\text{Co}, 3\text{Fe-4S}]$  na *DgFdII*, com uma taxa de conversão  $\text{Fe}_3\text{S}_4 \rightarrow \text{CoFe}_3\text{S}_4$  da ordem dos 80%, que aponta este processo como possível precursor para a formação de novos agregados, a partir de um centro  $\text{Fe}_3\text{S}_4$ , incorporado numa matriz proteica. A análise espectroscópica por RMN praticamente pioneira deste tipo de compostos heterometálicos revelou-se no entanto pouco conclusiva. À parte da atribuição das ressonâncias a cada uma das espécies presentes em solução, bem como da análise do comportamento dos respectivos desvios químicos com a temperatura, escassa foi a informação obtida, em grande parte devido às elevadas larguras de



linha dos sinais situados no envelope paramagnético do espectro, que dificulta grandemente, ou impossibilita mesmo a observação do Efeito Nuclear de Overhauser (ver secção I.10.1.3.), nestas espécies. Não deixa, no entanto de ser curioso verificar os espectros de RMN de próton de 1D desta espécie (Figuras V.2. e V.3.), que apresentam ressonâncias com desvios químicos desviados para campo baixo e campo alto, típicos de compostos com pares de valência mista, da mesma ordem de grandeza das presentes nos estados reduzidos da *DgFdI* e da *DgFdII*, respectivamente.

De um modo geral podemos concluir que a formação e os dados espectroscópicos deste agregado de cobalto, demonstra a possível utilidade deste tipo de centro como sonda para o estudo do mecanismo sintético proposto, no entanto, o paramagnetismo apresentado pelo ião  $\text{Co}^{+2}$  ( $S=3/2$ ), parece não simplificar o problema do magnetismo do quarto sítio do agregado, principalmente no que se refere à análise dos resultados de RMN. A inserção de uma espécie diamagnética no quarto sítio vago da *DgFdII*, como por exemplo o ião  $\text{Zn}^{+2}$  ( $d^{10}$ ) poderá ser à partida uma alternativa ao composto de cobalto. O facto de possuir as orbitais d completamente preenchidas, fazem com que o agregado [Zn, 3Fe-4S] tenha um tipo de comportamento muito próximo de um sistema de três spins, e não quatro como no caso do agregado [Co, 3Fe-4S]. No entanto, o facto do agregado  $[\text{Zn}, 3\text{Fe}-4\text{S}]^{+1}$  possuir um spin total  $S=5/2$ , não torna a análise deste sistema grandemente promissora relativamente à espectroscopia de RMN.

## V.6. Bibliografia

1. Moura, J. J. G., Moura, I., Kent, T. A., Lipscomb, J. D., Huynh, B. H., LeGall, J., Xavier, A. V., and Münck, E. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 6259-6267
2. Moura, I., Moura, J. J. G., Münk, E., Papaefthymiou, V., and LeGall, J. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 349
3. Surerus, K. K., Münk, E., Moura, I., Moura, J. J. G., and LeGall, J. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3805
4. Surerus, K. K. (1989), Universidade de Minnesota, USA
5. Moura, J. J. G. (1987) *Rev. Port. Quím.* **29**, 103-109
6. Moura, J. J. G., Macedo, A. L., and Palma, P. N. (1994) in *Inorganic Microbial Sulfur Metabolism* (Peck, H. D., Jr.; LeGall, J., ed) Vol. 243, pp. 165-188, Academic Press, Inc., San Diego, CA.
7. Münk, E., Papaefthymiou, V., Surerus, K. K., and Girerd, J. J. (1988) in *Metal Clusters in Proteins* (Que, L., Jr., ed) Vol. 372, pp. cap.15, ACS Symposium Series, Washington, DC
8. Macedo, A. L., Palma, N., Moura, I., LeGall, J., Wray, V., and Moura, J. J. G. (1993) *Magn. Res. Chem.* **31**, S59-S67
9. Bertini, I., Donaire, A., Felli, I., Luchinat, C., and Rosato, A. (1997) *Inorg. Chem.* **36**, 4798-4803
10. Cammack, R., Rao, K. K., Hall, D. O., Moura, J. J. G., Xavier, A. V., Bruschi, M., LeGall, J., Deville, A., and Gayda, J. P. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **490**, 311-321
11. Huynh, B. H., Moura, J. J. G., Moura, I., Kent, T. A., LeGall, J., Xavier, A. V., and Münck, E. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 3242-3244
12. Moreno, C., Macedo, A. L., Moura, I., LeGall, J., and Moura, J. J. G. (1994) *J. Inorg. Biochem.* **53**, 219-234

## **CAPÍTULO VI**

### **Caracterização de uma ferredoxina isolada de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774**

## **Caracterização de uma ferredoxina isolada de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774**

VI.1. Objectivo	145
VI.2. Materiais e métodos	145
VII.2.1. Purificação da ferredoxina de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ( <i>Dd</i> ) ATCC 27774 – <i>Dd27Fd</i>	147
VI.3. Resultados – Caracterização da <i>Dd27Fd</i>	148
VI.3.1. Espectroscopia de UV/Visível	148
VI.3.2. Determinação e análise da sequência NH <sub>2</sub> – terminal	150
VI.3.3. Determinação da absorvidade molar e do número de ferros	151
VI.3.4. Estrutura terciária	151
VI.3.5. Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)	151
VI.3.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	153
VI.3.6.1. RMN de protão de 1D e 2D	153
VI.3.6.2. Atribuição específica das ressonâncias aos ligandos dos protões dos agregados [4Fe-4S]	160
VI.3.7. Dependência angular das ressonâncias paramagnéticas	163
VI.4. Conclusões	165
VI.5. Bibliografia	168

## VI.1. Objectivo

Neste capítulo é descrito o isolamento e a caracterização bioquímica e espectroscópica de uma nova ferredoxina isolada de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. Pretende-se ainda, verificar se a técnica de RMN, conjuntamente com outras técnicas complementares, como sejam as espectroscopias de UV/Visível e RPE, utilizadas já na caracterização da DgFdII, se apresentam como um método eficiente na determinação e caracterização do tipo de centros [Fe-S] presentes nas ferredoxinas.

## VI.2. Materiais e métodos

*Desulfovibrio (D.) desulfuricans* (ATCC 27774) foi crescida num meio descrito por Liu e Peck [1]. Utilizou-se, como aceitador terminal de electrões, o nitrato em substituição do sulfato, de forma a promover a produção de reductase do nitrato e evitar a precipitação do sulfureto de ferro. As células foram suspensas em tampão Tris-HCl 10mM, pH 7.6, e lisadas num aparelho de pressão celular "French pressure" a 9000 Psi. O extracto foi posteriormente centrifugado a 19000 x g durante 30 min e seguidamente a 180000 x g durante 75 min. A ferredoxina *D. desulfuricans* (ATCC 27774) foi purificada de acordo com o processo descrito em VI.2.1. A proteína, durante o processo de purificação, foi concentrada utilizando uma unidade com uma célula agitadora, equipada com uma membrana para Diaflow YM5 da Amicon. As concentrações de proteína foram calculadas com  $\epsilon_{390\text{nm}} = 29000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . O grau de pureza da proteína foi estabelecido por electroforese em gel de poliacrilamida 17.5%, de modo idêntico ao descrito em VI.2.1.

A massa molecular da proteína pura foi determinada por filtração em gel, numa coluna pré-empacotada Superdex-75 HR 10/30 (Pharmacia Biotech Inc.), utilizando como padrões a albumina de soro bovino (67.000), a ovalbumina (43.000), a quimiotripsina (25.000), a ribonuclease (13.700) e a rubredoxina (6.000).

A determinação da sequência de amino ácidos foi feita num sequenciador de proteínas da Applied Biosystem 477A, acoplado a um analisador de amino ácidos Applied Biosystem 120A [2,3].

A quantificação da proteína foi feita pelo método do BCA, de acordo com as especificações do fabricante, utilizando a ferredoxina de *Pseudomonas nautica* como padrão.

A quantificação do ferro foi feita por um método químico utilizando 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) tal como descrito por Fischer e Price [4].

Os espectros de UV/Visível foram registados à temperatura ambiente ( $T_a$ ) na ausência de oxigénio, utilizando um espectrofotómetro Shimadzu UV-265 e uma célula anaeróbia de quartzo de 1cm.

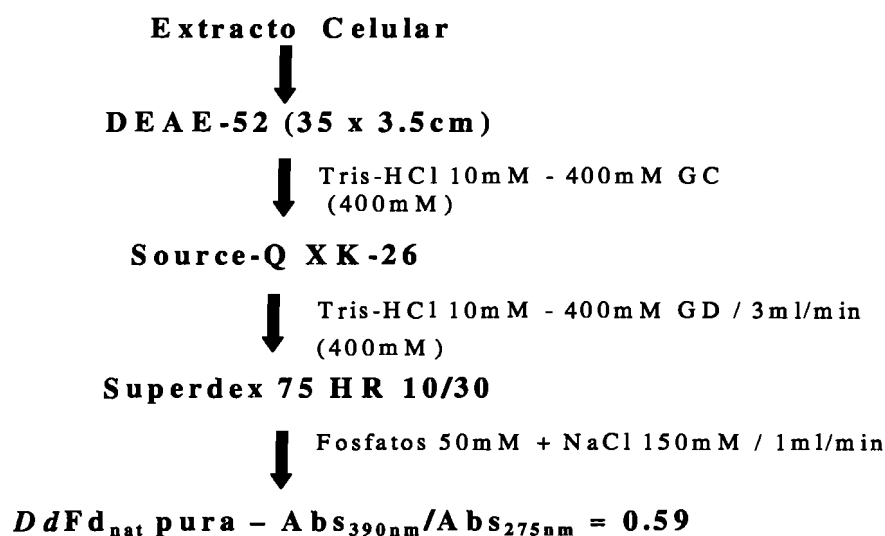
Os espectros de RPE foram adquiridos num aparelho Bruker EMX 8/2.7, equipado com um crióstato de fluxo contínuo da Oxford Instruments. As amostras foram preparadas com proteína pura com uma concentração de 150 $\mu$ M, em tampão fosfatos 100mM, pH 8.0. A redução das mesmas foi feita por adição de ditionito de sódio.

Os espectros de RMN de protão de alta resolução foram obtidos num espectrómetro Bruker ARX de 400MHz, equipado com uma unidade de controlo de temperatura. Os valores de desvio químico são definidos em partes por milhão (ppm) relativamente ao 3-trimetilsilil-(2,2,3,3 -  $^2\text{H}_4$ ) propionato. Os valores positivos referem-se a desvios para campo baixo. As amostras foram preparadas com proteína pura a uma concentração de 2mM, equilibrada com tampão fosfatos 100mM, pH 8.0 e permutadas quatro vezes com 99.9%  $^2\text{H}_2\text{O}$  sobre fluxo contínuo de Árgon.

Os espectros "Phase Sensitive" NOESY foram adquiridos e processados como descrito em III.3, utilizando larguras de varrimento de 200 ppm. Os valores de  $T_1$  foram calculados utilizando a sequência de inversão-recuperação [5], com treze tempos de espera entre 0.1ms e 2s.

### ***VI.2.1. Purificação da ferredoxina de *D.desulfuricans* (*Dd*) ATCC 27774 – *Dd27Fd****

A purificação da *Dd27Fd* foi efectuada segundo o esquema de purificação apresentado na Figura VI.1, à temperatura de 4°C, com todos os tampões referidos durante as várias etapas a pH 7.6 e devidamente desarejados sobre fluxo continuo de Azoto. A recolha da proteína foi também feita sobre fluxo continuo de azoto em frascos previamente desarejados.

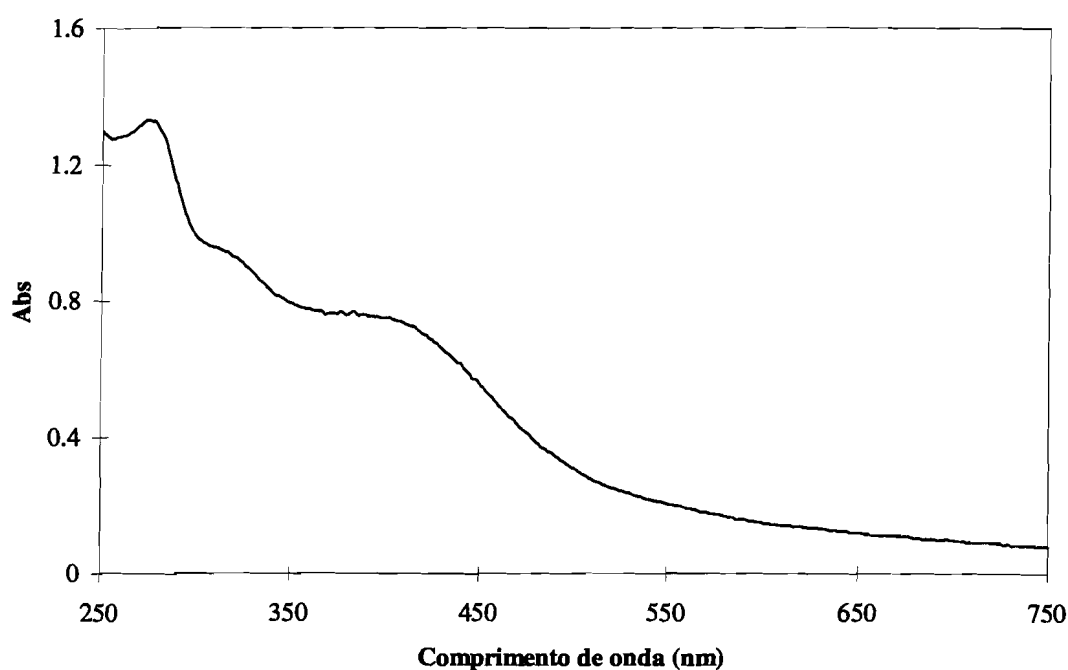


**Figura VI.1.** Esquema geral de purificação da *Dd27Fd<sub>nat</sub>*. Os tampões indicados referem-se aos tampões de eluição da proteína das respectivas colunas. Entre parêntesis encontra-se indicada a força iónica a que a proteína foi eluída. GC-gradiente continuo GD-Gradiente descontinuo.

### VI.3. Resultados – Caracterização da *Dd27Fd*

#### VI.3.1. Espectroscopia de UV/Visível

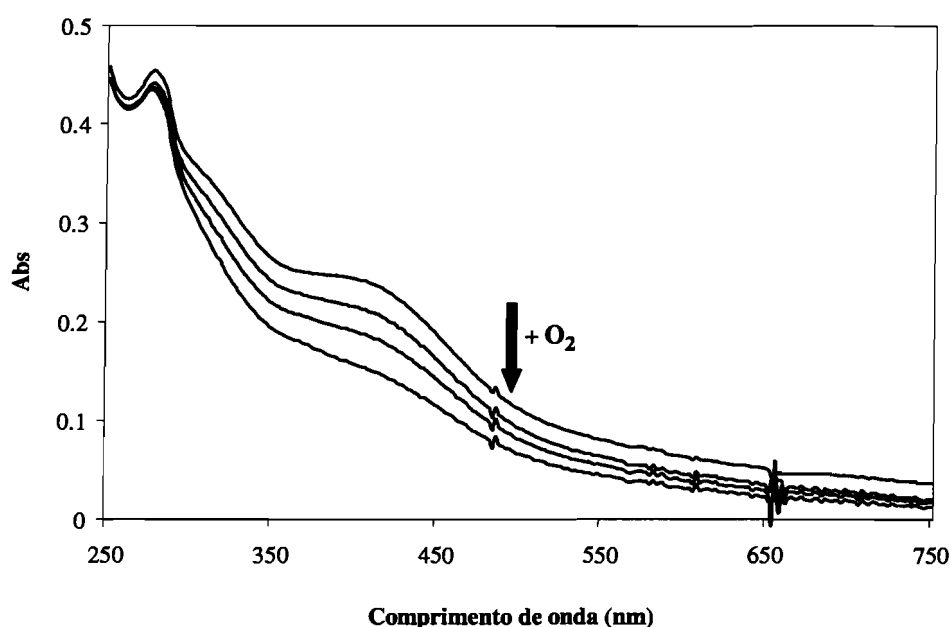
O espectro de UV/Visível da *Dd27Fd* pura no estado nativo, é apresentado na Figura VI.2. Como pode verificar-se, o espectro apresenta dois máximos de absorção a 275nm e 390nm, características das ferredoxinas. A razão  $Abs_{390nm}/Abs_{275nm} = 0.59$  apresentada, é referida para a proteína pura.



**Figura VI.2.** Espectro de UV/Visível da *Dd27Fd*<sub>nat</sub>. A proteína encontra-se dissolvida em tampão fosfatos 50mM, pH 7.6 + 150mM NaCl.  $Abs_{390nm}/Abs_{275nm} = 0.59$ .



O facto de ter-se verificado que a quantidade de proteína obtida era praticamente residual, quando o processo de purificação era realizado em condições aeróbias, levou não só a mudar as condições deste processo, mas também a que fosse realizado um estudo de modo a verificar a estabilidade da *Dd27Fd* ao oxigénio. Este estudo encontra-se documentado pela Figura VI.3., na qual pode ser observado o desaparecimento da banda a 390nm, ao longo do tempo de exposição ao ar.



**Figura VI.3.** Estudo da influência do oxigénio no espectro de UV/Visível da *Dd27Fd*, por exposição da proteína ao ar. A proteína encontra-se dissolvida em tampão fosfatos 50mM, pH 7.6 + 150mM NaCl, e a uma temperatura de 4°C. Os espectros são obtidos com diferenças de 20 min entre si.

Pode assim, facilmente concluir-se acerca da sensibilidade que esta proteína apresenta ao oxigénio, que é demonstrada pela perda do(s) agregado(s) [Fe-S], com o concomitante desaparecimento da banda de transferência de carga a 390nm, e a inalterabilidade da banda a 275nm, características respectivamente dos centros [Fe-S] e de todas as proteínas.

### VI.3.2. Determinação e análise da sequência NH<sub>2</sub> – terminal

Na Figura VI.4. é apresentada a sequência NH<sub>2</sub>-terminal da *Dd27Fd*, composta por 60 resíduos de amino ácidos, com oito resíduos cisteicos, Cys 11, Cys 14, Cys 17, Cys 21, Cys 41, Cys 44, Cys 47 e Cys 51, responsáveis pela coordenação dos dois agregados [4Fe-4S]. Como pode verificar-se pela comparação da sequência de amino ácidos desta proteína com outras de 7Fe e 8Fe, a sua cadeia polipeptídica possui 8 cisteínas para a ligação de dois centros [4Fe-4S], sendo a sua sequência muito idêntica, às já caracterizadas ferredoxinas de 8Fe de *Pa*, *Cp*, *Cau* e *Cv*, para as quais é já conhecida a estrutura 3D, e ainda *DdN*, com uma maior analogia relativamente a esta última, o que seria de esperar, dado pertencerem à mesma bactéria embora as estirpes diferentes. A única exceção relativamente à sequência típica das ferredoxinas de 8Fe, será um resíduo ácido glutâmico logo a seguir ao último resíduo cisteico Cys 51, tal como acontece para a ferredoxina de 7Fe de *Da*, a qual representa também uma exceção à regra neste mesmo ponto, dentro da sequência típica das ferredoxinas de 7Fe.

<i>CauFd</i>	AYVINEA	I--S	GA	EPE	PVNAI-SSGDDRYVIDADT	ID	G-----A	AGV	PVDAPVQA
<i>CvFd</i>	ALMITDQ	I--N	NV	EPE	PNGAI-SQGDETYVIEPSL	TE	VGHYETSQ	VEV	PVDCI IKDP
<i>PaFd</i>	AYVINDS	I--A	GA	KPE	PVNCI--NNGAIY AIDADS	ID	G-----S	ASV	PVGAPNPED
<i>CpFd</i>	AYKIADS	V--S	GA	ASE	PVNAI-SQGDSIFVIDADT	ID	G-----N	ANV	PVGAPVQE
<i>DdNFd</i>	MGYSVIVDSK	I--G	GE	VDV	PVEVYELQNGKAVPVNEEE	LG	E-----S	IEV	PQNAI-VE
<b><i>Dd27Fd</i></b>	GYNVNVDVK	I--G	GE	VDV	PVEVYEIKDSKAEAVSPEE	LG	E-----S	?TV	EVNAITDEN
<i>PnFd</i>	AFIVTDN	IKCKYTD	VEV	PVDCFYEGP-NFLVI?PDE	ID	A-----L	EPE	PAIFSED	
<i>DaFdIII</i>	GYKITIDTDK	T--GDGE	VDV	PVEVYEIQDGKAVAVNEDE	LG	E-----S	VEV	EQDALTVEEN	
<i>CvFd</i>	SHEETEDELRAKYERITGEG								

**Figura VI.4.** Comparação da sequência de amino ácidos da ferredoxina de *Dd* ATCC 27774 (*Dd27Fd*) com outras ferredoxinas de 7Fe e 8Fe. (8Fe)*Cau* – *Clostridium acidi urici* [6], (8Fe)*Cv* – *Chromatium vinosum* [7], (8Fe)*Pa* – *Peptococcus aerogenes* [8], (8Fe)*Cp* – *Clostridium pasteurianum* [8], (8Fe)*DdN* – *Desulfovibrio desulfuricans* Norway [9], (7Fe)*Pa* – *Pseudomonas nautica* [10], (7Fe)*Da* – *Desulfovibrio africanus* [11]

### ***VI.3.3. Determinação da absorvidade molar e do número de ferros***

A partir do ensaio de determinação da quantidade de proteína, em que foi utilizada a ferredoxina de *Pseudomonas nautica*, foi obtido um valor de  $28700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para a absorvidade ( $\epsilon$ ) molar da *Dd27Fd* a 390nm. O número de ferros obtido por monômero foi de 7.53, confirmando a existência de uma ferredoxina de 7Fe ou 8Fe.

### ***VI.3.4. Estrutura terciária***

A determinação da massa molecular da *Dd27Fd*<sub>nat</sub>, e tendo em conta a massa molecular do monômero de 6.4kDa, determinada a partir da sequência de amino ácidos (Figura VI.4.), revela um valor de 13.4kDa. Pode desta forma concluir-se que esta proteína no seu estado nativo é um dímero ( $13.4\text{kDa} \approx 2 \times 6.4\text{kDa}$ ).

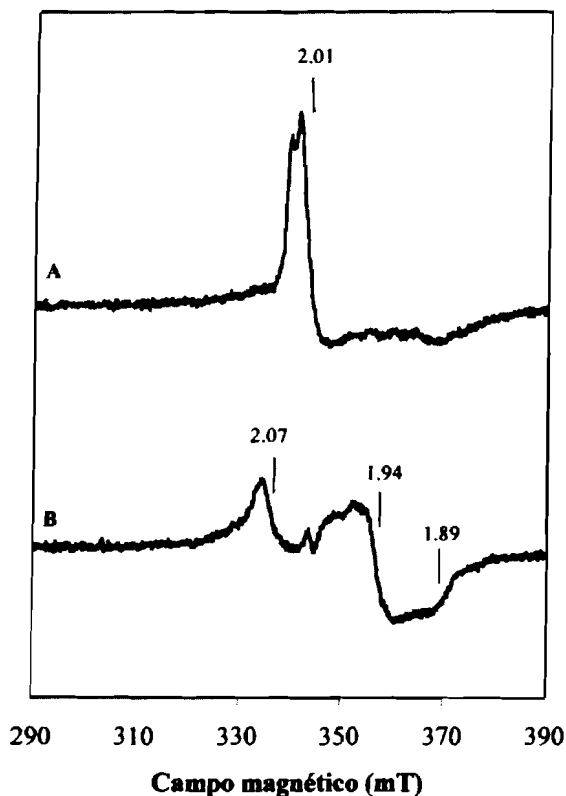
### ***VI.3.5. Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)***

Na Fig. VI.5. podem ser observados os espectros de RPE da *Dd27Fd* em ambos os estados nativo (**A**) e reduzido (**B**) a baixa temperatura (12.5K).

No estado nativo pode observar-se um sinal anisotrópico centrado a  $g=2.01$ , similar ao encontrado em proteínas que contêm um centro  $[3\text{Fe}-4\text{S}]$  no estado oxidado +1 [12,13].

No estado totalmente reduzido verifica-se o aparecimento de um sinal rômbico com valores de  $g$  de 2.07, 1.94 e 1.89, já observado para a ferredoxina de 8Fe de *Chromatium vinosum* [14], atribuído aos centros  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$  no estado reduzido +1, com  $S=1/2$ .

Da dupla integração de ambos os sinais, obtém-se um valor de 1.86 para o quociente  $[4\text{Fe-4S}]/[3\text{Fe-4S}]$ .

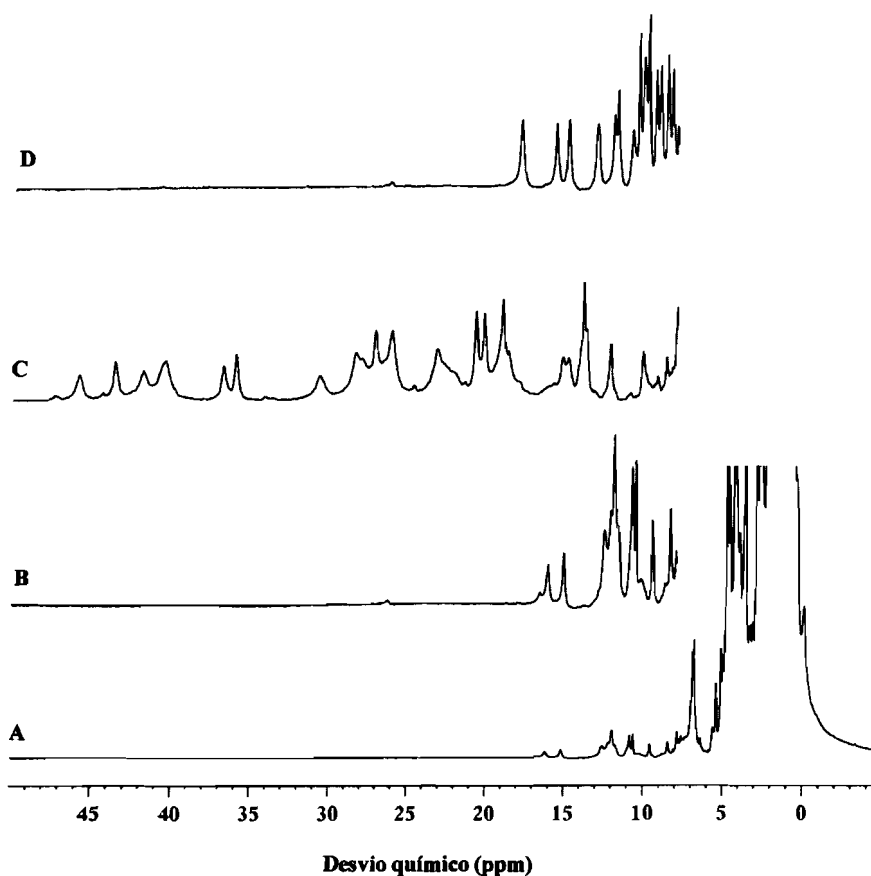


**Figura VI.5.** Espectro de RPE da *Dd27Fd*. A- Estado nativo B- Estado reduzido por adição de ditionito de sódio. Os espectros foram adquiridos a uma temperatura de 12.5K; ganho de  $20 \times 10^3$ ; amplitude de modulação de 4.05Gpp; frequência de 9.65GHz e potência de 2.007mW.

### VI.3.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

#### VI.3.6.1. RMN de próton de 1D e 2D

Os espectros de RMN da *Dd27Fd* nos estados nativo (**A,B**), reduzido (**C**), obtido por adição de ditionito de sódio e oxidado (**D**), são apresentados na Figura VI.6. O estado oxidado (**D**), é obtido por reoxidação ao ar do estado reduzido (**C**).



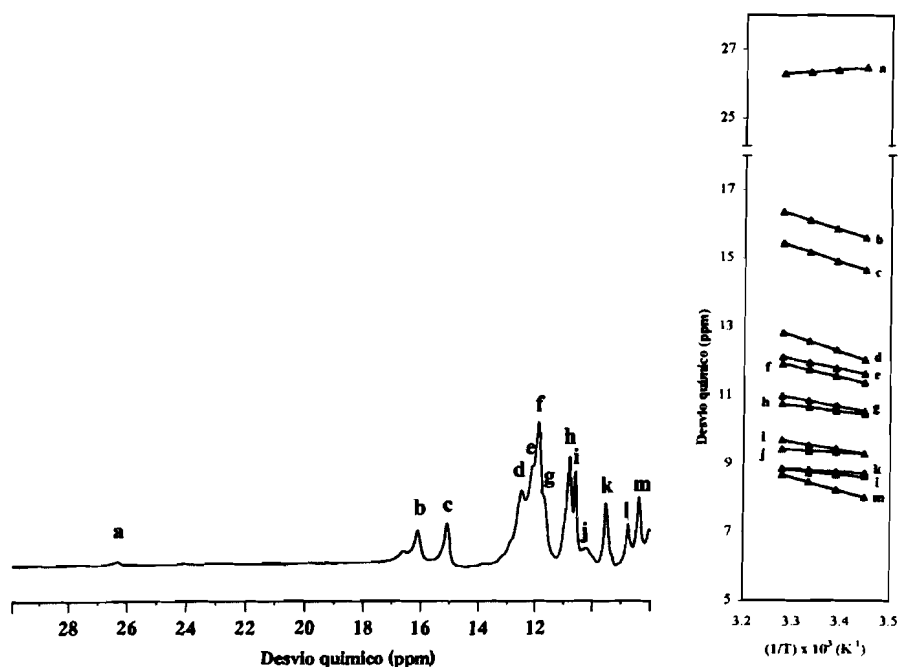
**Figura VI.6.** Espectros de RMN de próton a 400MHz da *Dd27Fd* (com supressão do pico da água). A- Espectro completo do estado nativo (*Dd27Fd<sub>nat</sub>*) B- Região a campo baixo da *Dd27Fd<sub>nat</sub>* C- Estado reduzido (*Dd27Fd<sub>red</sub>*) e D- Estado oxidado (*Dd27Fd<sub>ox</sub>*).

**O estado nativo –  $Dd27Fd_{nat}$** 

Na Fig.VI.7. pode observar-se o espectro de RMN da  $Dd27Fd_{nat}$  com as ressonâncias a campo baixo marcadas de **a** a **m**, bem como a respectiva dependência de temperatura na gama de temperaturas de trabalho.

A integração dos picos **a**, **c** e **d**, fornece uma relação de 1:4:4.

A fraca resolução espectral obtida, impossibilitou a determinação, tanto dos valores de  $T_1$  para as ressonâncias marcadas, como a atribuição específica das mesmas, devido à escassa informação resultante das experiências de NOE 1D e NOESY 2D.

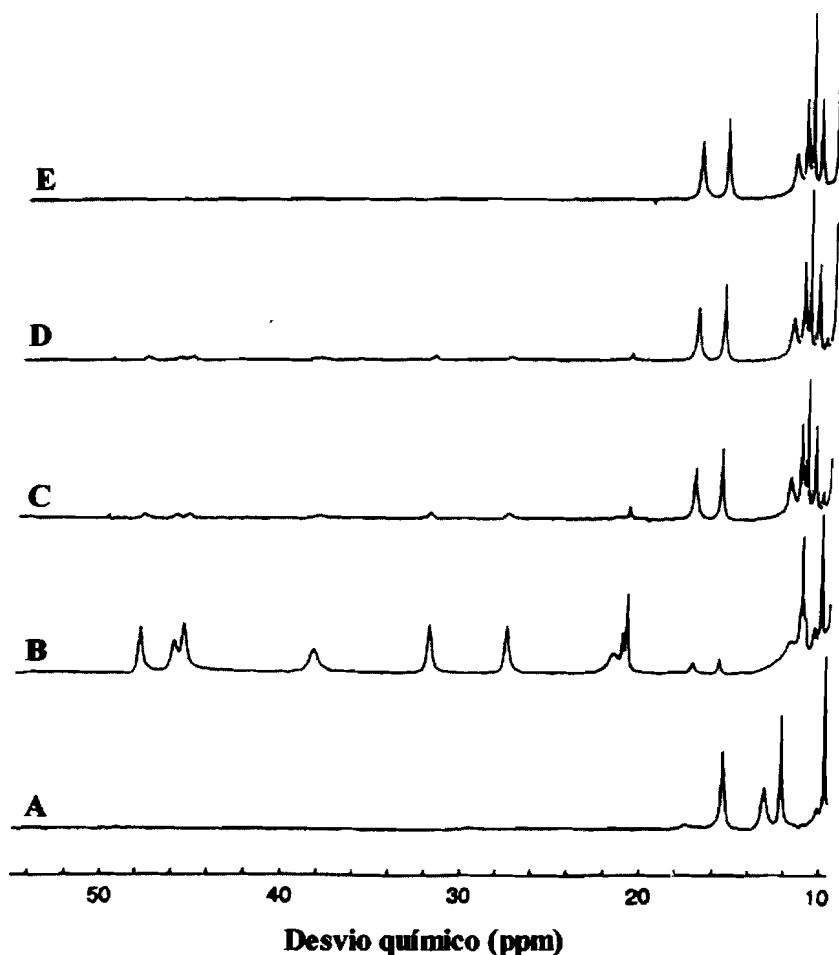


**Figura VI.7.** Espectro de RMN de próton a 400MHz da região a campo baixo da  $Dd27Fd_{nat}$  com as ressonâncias marcadas de **a** a **m** (com supressão do pico da água), e estudo do comportamento das mesmas com a temperatura.

Por analogia com os espectros de RMN e as dependências com a temperatura das ressonâncias da ferredoxina de 7Fe de *Desulfurolobus ambivalens* [15] e das proteínas FdII e FdI de *Desulfovibrio gigas* de 3Fe e 4Fe respectivamente [16,17], pode atribuir-se a ressonância **a**, a um centro de 3Fe e as ressonâncias **b** e **c** a um dos dois centros de 4Fe.

A ressonância **a**, apresenta um desvio químico e uma dependência com a temperatura tipo *Curie*, típica de uma ressonância pertencente a um próton  $\beta$ -CH<sub>2</sub> de um ligando 3Fe. As restantes ressonâncias têm dependências de temperatura do tipo *anti-Curie*, tal como todas as ressonâncias pertencentes aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> pertencentes a ligandos 4Fe no estado oxidado. O espectro de RMN de próton da *Dd27Fd<sub>nat</sub>*, pouco típico para ferredoxinas de 8Fe, deve-se provavelmente ao facto da proteína ter sido purificada em condições de anaerobiose.

Um facto idêntico encontra-se também documentado para a *DgFdI* (ver Figura VI.8.) [18], em que o espectro da proteína nativa purificada em condições aeróbias, é diferente do espectro da *DgFdI* purificada na ausência de oxigénio, relativamente às ressonâncias desviadas para campo mais baixo. Verifica-se no entanto, que o espectro obtido por reoxidação do centro de 4Fe da proteína purificada aerobiamente, após ter sido reduzida é idêntico ao do estado oxidado da proteína purificada anaerobiamente. No presente caso da *Dd27Fd<sub>nat</sub>*, encontra-se presente uma mistura de 75% de dois agregados de 4Fe com 25% de um agregado de 3Fe. O(s) agregado(s) de 4Fe, parece(m) no entanto apresentar, uma conformação diferente da habitual para as ferredoxinas de 8Fe no estado nativo, a qual é estabelecida após reoxidação do estado reduzido, originando o estado *Dd27Fd<sub>ox</sub>*, característico deste tipo de ferredoxinas, e que é caracterizado na página 157.



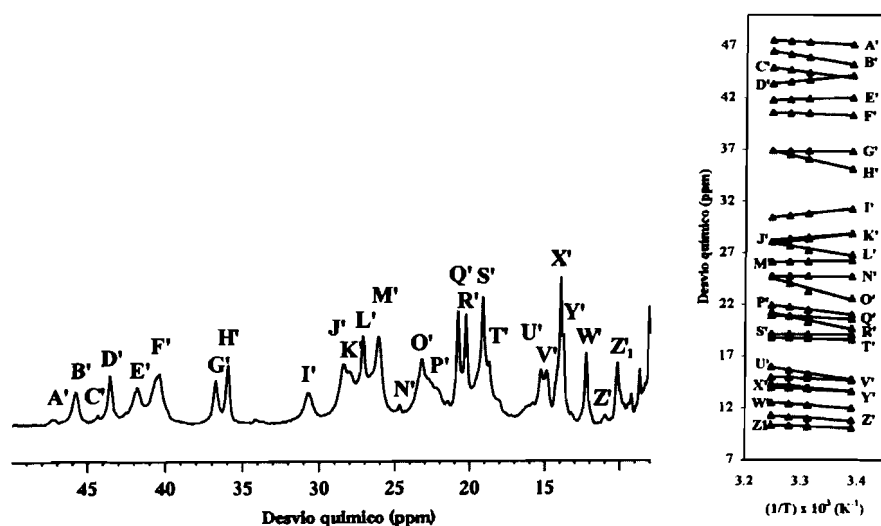
**Figura VI.8.** Espectros de RMN de próton a 300MHz da FdI de *D.gigas* purificada aerobiamente. **A** – Proteína nativa (estado oxidado). **B** – estado reduzido com ditionito (já visível o sinal da proteína reoxidada). **C-E** – ciclo de reoxidação com ar. ( Figura gentilmente cedida por Macedo e colaboradores [18] )

#### O estado reduzido – $Dd27Fd_{red}$

A Figura VI.9. representa o espectro de RMN de próton da zona a campo baixo do estado reduzido da  $Dd27Fd$ , com as ressonâncias marcadas de A' a Z1', bem como a respectiva dependência com a temperatura na gama de temperaturas de trabalho. Este estado é obtido por adição de ditionito de sódio, tanto ao estado nativo como ao estado oxidado, obtido por reoxidação deste mesmo estado reduzido (ver Figura VI.6). No estado reduzido, a  $Dd27Fd$  apresenta ressonâncias desviadas para campo mais baixo, resultante de um aumento



do paramagnetismo dos centros de 4Fe reduzidos ( $S=1/2$ ). A dependência destas ressonâncias com a temperatura, revela agora uma mistura de comportamentos *Curie* e *anti-Curie*, característico de proteínas contendo um [16] ou dois [19] agregados de 4Fe. Este estado reduzido não é estável por um longo período de tempo, nas condições experimentais de trabalho em RMN, e tende a retornar ao estado totalmente oxidado, não apresentando variações no seu espectro de RMN de próton de 1D.

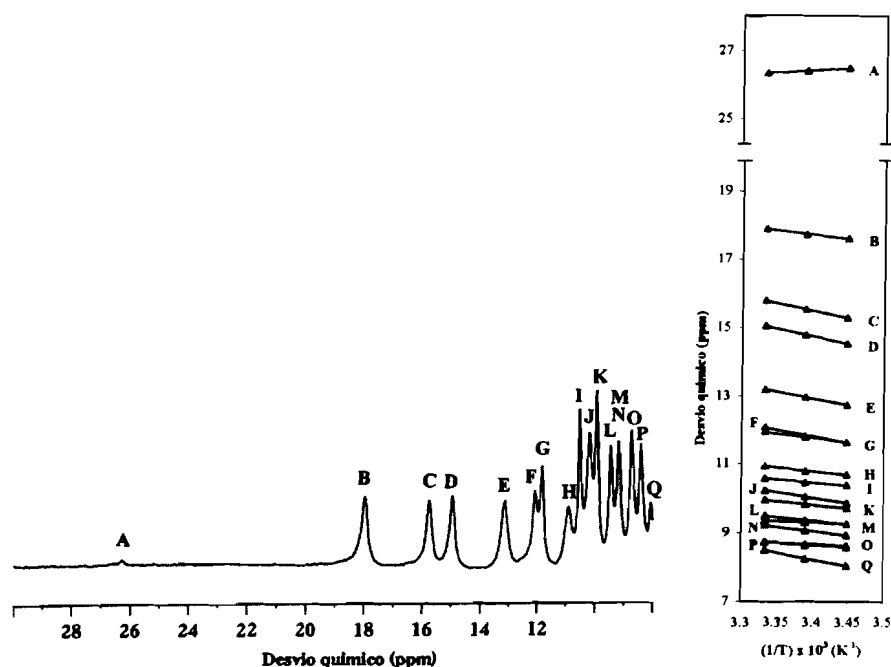


**Figura VI.9.** Espectro de RMN de próton a 400MHz da região a campo baixo da *Dd27Fd<sub>red</sub>* com as ressonâncias marcadas de A' a Z<sub>1</sub>' (com supressão do pico da água), e estudo do comportamento das mesmas com a temperatura.

#### O estado oxidado – *Dd27Fd<sub>ox</sub>*

O espectro de RMN de próton da região a campo baixo da *Dd27Fd<sub>ox</sub>* é apresentado na Figura VI.10. Como se pode verificar, o espectro apresenta um conjunto de ressonâncias bem definido na região do espectro entre 7 e 20 ppm, e a ressonância A, já referida atrás como a, e atribuída a um centro 3Fe presente minoritariamente.

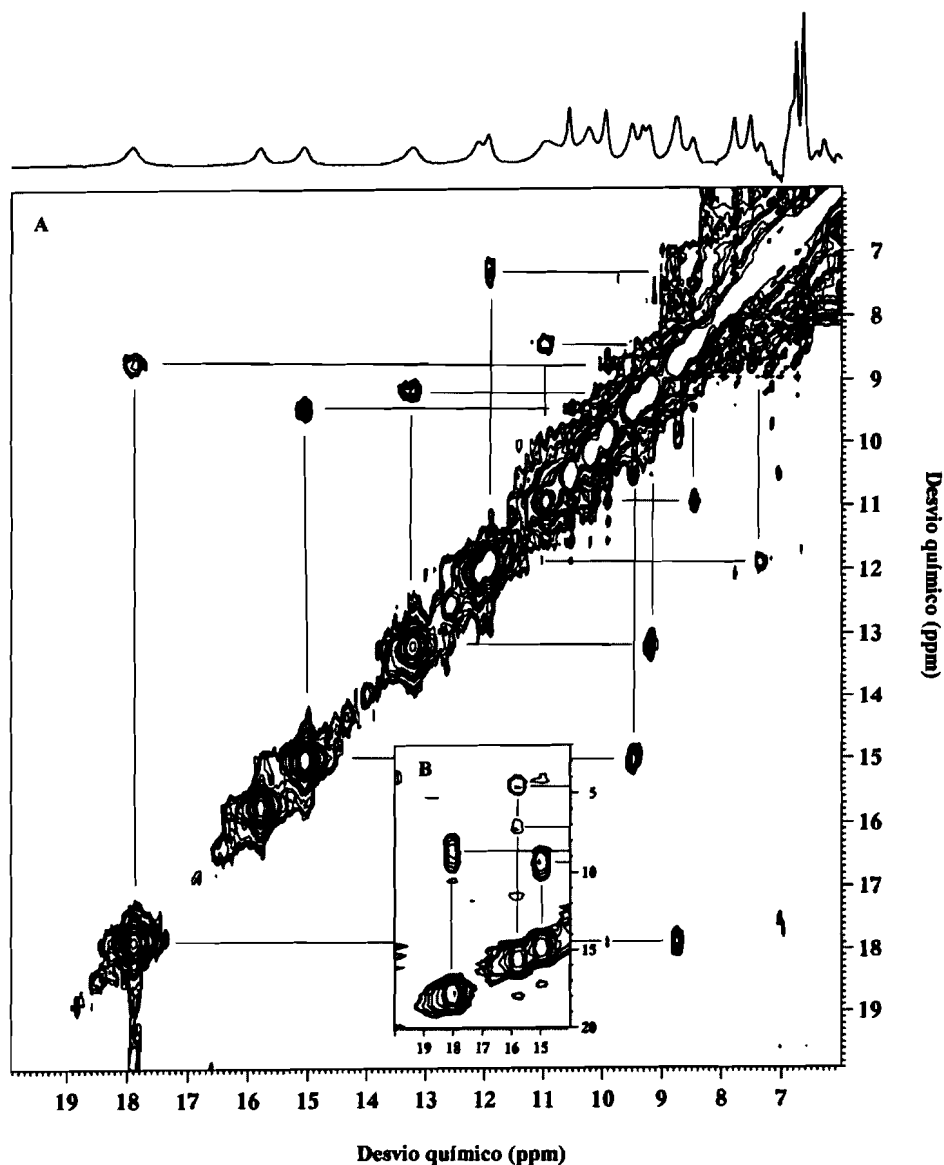
A integração dos sinais A, B, C, D e E, apresenta agora uma proporção de 1:7:5:5:5, o que reflecte uma diminuição da percentagem de agregado 3Fe relativamente ao  $2x[4Fe-4S]$ , comparativamente com o estado nativo.



**Figura VI.10.** Espectro de RMN de próton a 400MHz da região a campo baixo da  $Dd27Fd_{ox}$  com as ressonâncias marcadas de A a Q (com supressão do pico da água), e estudo do comportamento das mesmas com a temperatura.

Este espectro é bastante homólogo ao apresentado por outras ferredoxinas de 8Fe no estado oxidado, como por exemplo as de *Clostridium acidi urici* [20] e *Clostridium pasteurianum* [21]. A dependência com a temperatura apresentada por estas ressonâncias é uniformemente do tipo *anti-Curie* (excepto para a ressonância A), característica das ressonâncias pertencentes aos prótons  $\beta-CH_2$  de agregados de 4Fe no estado oxidado. Algumas destas ressonâncias, desviadas isotropicamente, têm como característica valores de  $T_1$  muito baixos. Os resultados destas medidas são apresentados na Tabela VI.1. (ver secção VI.3.6.2.).

Os espectros NOESY 2D, a 300K da  $Dd27Fd_{ox}$  com tempos de mistura de 5ms e 10ms, são apresentados na Figura VI.11.. Estes dois espectros permitem fazer a atribuição de sete dos oito pares de prótons  $\beta-CH_2$  dos ligandos cisteicos que coordenam os agregados de 4Fe, bem como alguns dos prótons  $\alpha-CH$  (Tabela VI.1).



**Figura VI.11.** Espectros NOESY 2D de RMN de próton, a 400MHz, da região a campo baixo da  $DdFd27_{ox}$  em  $^2H_2O$  (pH 7.6), 300K. **A**- tempo de mistura de 5ms. **B** – tempo de mistura de 10ms.

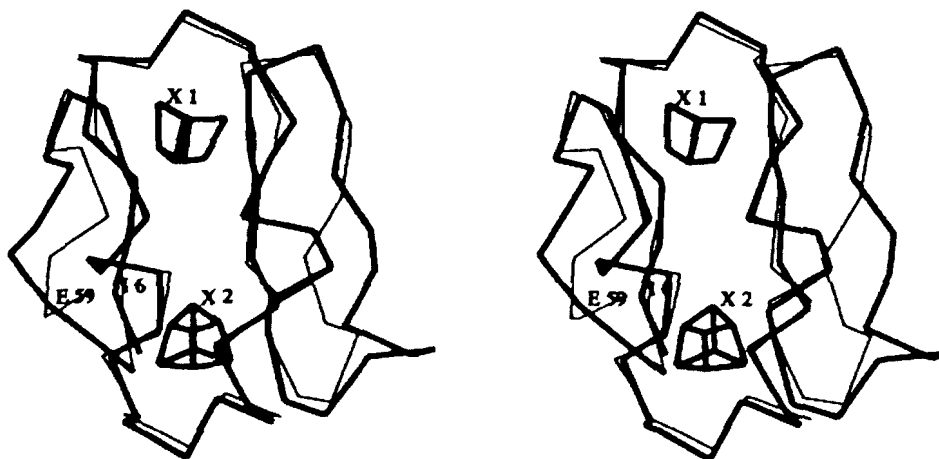
### ***VI.3.6.2. Atribuição específica das ressonâncias aos ligandos dos prótons dos agregados [4Fe-4S]***

A dependência *anti-Curie* com a temperatura e os rápidos tempos de relaxação, permitem afirmar que as ressonâncias de *Dd27Fd<sub>ox</sub>*, marcadas de **B** a **J**, pertencem aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> e  $\alpha$ -CH das cisteínas que coordenam os agregados [4Fe-4S].

Da análise da Figura VI.11., pode-se verificar que as ressonâncias **B**, **O** e **K** estão correlacionadas. Atendendo à intensidade dos picos cruzados apresentados entre si, aos valores de  $T_1$  que apresentam e ao mesmo tipo de dependência com a temperatura, podem atribuir-se respectivamente aos dois prótons  $H\beta$  e  $H\alpha$  do mesmo resíduo cisteico. A ressonância **C** encontra-se correlacionada com outras duas ressonâncias a 4.8 e 7.5 ppm, atribuídas respectivamente aos prótons  $H\beta$  e  $H\alpha$ , tendo em conta a sua dependência com a temperatura e a intensidade dos picos cruzados. Verificam-se ainda correlações entre as ressonâncias **D** e **L**, **E** e **N**, **F** e 7.8 ppm, **G** e 7.3 ppm e por último, **H** e **P**, todas elas atribuídas ao par de prótons  $H\beta$  do respectivo resíduo cisteico a que pertencem. Para as ressonâncias **I** e **J** não foi possível observar qualquer correlação.

Uma tentativa de atribuição específica destas ressonâncias aos resíduos cisteicos que coordenam os dois agregados [4Fe-4S], bem como a designação destes, foi também realizada. Para isso, foi tida em conta, não só, a homologia entre as cadeias polipeptídicas da *Dd27Fd*, *DdNFd*, *CpFd* e *PaFd* (Figura VII.4.), como as estruturas em solução de *CpFd* [22] e de raios-X de *PaFd* [23], que confirmam a atribuição dos ligandos cisteicos que coordenam os centros [4Fe-4S], e ainda a homologia entre as estruturas tridimensionais de *PaFd* e *DdNFd* [24]. Esta homologia é baseada num modelo tridimensional da *DdNFd*, construído tendo em conta a sequência química e a estrutura de raios-X da homóloga *PaFd* [25], tendo-se verificado uma

grande similaridade entre as duas estruturas, com ligeiras diferenças no enrolamento da cadeia principal entre os resíduos 23-30 (Figura VI.12.).



**Figura VI.12.** Representação em estéreo das estruturas das ferredoxinas de *P.aerogenes* (linhas finas) e de *D.desulfuricans* Norway (linhas grossas). A geometria exacta e posição relativa dos dois agregados [4Fe-4S], encontram-se estritamente sobrepostas para ambas as proteínas. As duas proteínas diferem significativamente na região do "loop" que contém os resíduos 23-30. ( Figura retirada de [9] )

A grande homologia entre os espectros de RMN de protão de 1D, e NOESY 2D, das ferredoxinas de *Cp* e *Dd27*, conjuntamente com os factos referidos anteriormente, permitiu então uma tentativa de atribuição específica das ressonâncias pertencentes aos protões  $\beta$ -CH<sub>2</sub> e alguns  $\alpha$ -CH das cisteínas que coordenam ambos os agregados [4Fe-4S], designados na Tabela VI.1. por agregados I e II.

**Tabela VI.1.** Resumo dos parâmetros espectrais de RMN a 300K e pH 8.0, e atribuição específica mais provável das ressonâncias dos prótons das cisteínas que coordenam os agregados I e II de [4Fe-4S] em *Dd27Fd<sub>ox</sub>*. n.d.- não determinado.

Sinal	Protões	$\delta$ (ppm)	T1 (ms)	Atribuição mais provável	
				Agregado	Sequência específica
B	$\beta$ -CH	18.0	3.5	II	Cys 44
O	$\beta$ -CH	8.8	9.6		
K	$\alpha$ -CH	10.0	14.0		
C	$\beta$ -CH	15.8	4.5	II	Cys 47
	$\beta$ -CH	4.8	n.d		
	$\alpha$ -CH	7.5	n.d		
D	$\beta$ -CH	15.0	4.3	I	Cys 14
L	$\beta$ -CH	9.5	9.8		
E	$\beta$ -CH	13.2	4.8	I	Cys 17
N	$\beta$ -CH	9.2	8.9		
F	$\beta$ -CH	12.1	5.2	I	Cys 51
	$\beta$ -CH	7.8	n.d		
G	$\beta$ -CH	11.9	7.8	II	Cys 21
	$\beta$ -CH	7.3	n.d		
H	$\beta$ -CH	10.9	3.2	II	Cys 41
P	$\beta$ -CH	8.4	9.7		
J	$\beta$ -CH	10.2	5.5	I	Cys 11
I	$\alpha$ -CH	10.5	22.1		

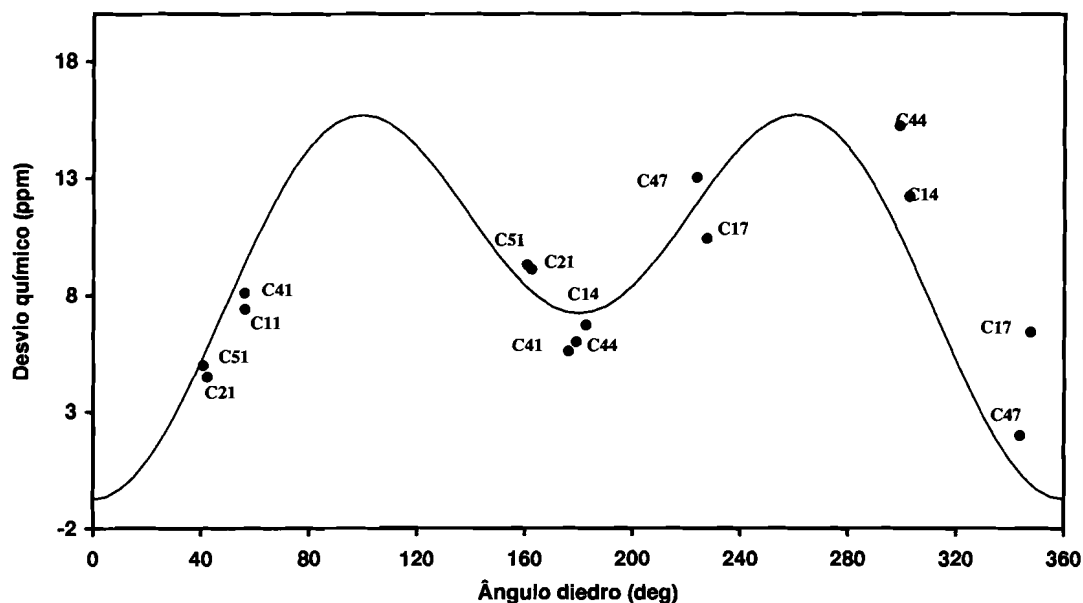
Por comparação com os espectros de RMN de *CpFd*, seria de esperar uma maior informação na zona dos prótons aromáticos e mesmo na restante região diamagnética do espectro, permitindo obter todas as outras correlações não observadas. Parece assim necessário, uma análise mais profunda dos espectros NOESY 2D, com diferentes condições experimentais, nomeadamente outros tempos de mistura, bem como a realização de espectros COSY e TOCSY, de forma a obter um maior numero de correlações entre os prótons, permitindo uma maior certeza na sua atribuição específica.

### VI.3.7. Dependência angular das ressonâncias paramagnéticas

Estudos recentes de RMN em compostos modelo de  $[4\text{Fe-4S}]^{+3}$  [26] e proteínas  $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$  [20], estabeleceram que a interacção hiperfina isotrópica dos prótons situados no átomo de carbono mais próximo do átomo de ferro, é uma função do ângulo diedro  $\theta$ , definido pelos quatro átomos H-C-S-Fe, como já foi referido e analisado em III.4.4..

Utilizando a equação  $\delta = a \sin^2(\theta) + b \cos(\theta) + c$ , foram representados graficamente os valores dos desvios paramagnéticos dos prótons  $\beta\text{-CH}_2$  dos resíduos cisteicos de *CauFd*<sub>ox</sub>, versus os valores dos ângulos diedros obtidos a partir da sua estrutura de raios-X [27]. O melhor ajuste para a equação, utilizando um erro de 2 ppm para os desvios químicos e 5 graus para os ângulos diedros, com uma precisão de 0.01, originou valores de **a**, **b** e **c** de 12.2, -3.9 e 3.232, respectivamente (Figura VI.13). O valor de **a** positivo indica que o mecanismo de deslocalização de spin é essencialmente  $\pi$ , embora o valor de **b** diferente de zero, sugere que o mecanismo  $\sigma$  de deslocalização de spin não deva ser negligenciado.

Se forem assumidos os mesmos valores de  $\theta$  para *Dd27Fd* e *CauFd*, os desvios químicos dos prótons  $\beta$ -cisteicos de *Dd27Fd*<sub>ox</sub>, após subtracção da contribuição diamagnética (valor médio de 2.8 ppm), podem ser analisados na Figura VI.13.. Como se pode observar, existe uma boa concordância para praticamente todos os prótons, com um ligeiro afastamento da curva gerada para um dos sinais atribuídos às cisteínas 17 e 44, que apresentam um desvio à curva gerada, o que indica que não se conseguirá um bom ajuste à curva através de uma mera variação do valor de  $\theta$ . Para a cisteína 44, este facto não é inédito, tendo-se já verificado com a correspondente cisteína 40, na ferredoxina de 8Fe de *Chromatium vinosum* (*CvFd*) [14]. Esta perturbação, parece resultar, não de uma mudança global na estrutura electrónica do agregado  $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$ , mas local neste resíduo cisteico, dado que os desvios químicos associados com os outros ligandos do mesmo agregado permanecem praticamente inalterados.



**Figura VI.13.** Melhor ajuste para a equação  $\delta = a \sin^2(\theta) + b \cos(\theta) + c$ , que relaciona os desvios hiperfinos dos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> dos resíduos cisteicos coordenantes de *CauFd*<sub>ox</sub> obtidos por RMN, com os correspondentes ângulos diedros Fe-Sγ-Cβ-Hβ de *CauFd*, obtidos a partir da sua estrutura de raios-X [27]. Na figura encontram-se assinalados os prótons β de cada uma das cisteínas coordenantes de *Dd27Fd*, com exceção de um dos prótons β-CH<sub>2</sub> da cisteína 11, para o qual se desconhece o valor do desvio químico.

Estes resultados, revelam-se assim bastante concordantes para com as atribuições específicas das ressonâncias dos prótons β-CH<sub>2</sub> das cisteínas que coordenam os agregados [4Fe-4S], dado o bom resultado para o melhor ajuste, com exceção da cisteína 44.



## VI.4. Conclusões

Os estudos realizados com a proteína de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, revelam estarmos na presença de uma ferredoxina com dois centros [4Fe-4S], composta por 60 resíduos de amino ácidos, apresentando-se sob a forma de dímero com uma massa molecular de 6.4kDa por monómero.

Este trabalho veio a confirmar em primeiro lugar, a importância fulcral da existência de um padrão semelhante na sequência de amino ácidos ferredoxinas, contendo o mesmo tipo de agregado. A existência de oito resíduos cisteicos, bem como da sua posição na sequência primária da proteína, típica em ambos os casos de uma ferredoxina de 8Fe, faz prever logo à partida uma coordenação de dois agregados [4Fe-4S].

Os resultados obtidos por RPE, tornam-se isoladamente pouco conclusivos. A confirmação da existência de um centro de 3Fe e outro(s) de 4Fe, com a obtenção de um sinal típico de um centro de 3Fe para o estado oxidado, e de outro de certa forma algo atípico, observado também para a ferredoxina de 8Fe de *Cv* [14], de um ou dois centros de 4Fe para o estado reduzido, vem a ser confirmada pelos dados obtidos por RMN. A forma pouco típica do espectro de RPE do estado reduzido, reside na diferença apresentada pelo sinal a  $g=1.94$ , devida talvez a uma diferente distribuição do par de valência mista ( $Fe^{+2}-Fe^{+3}$ ) em um ou ambos os agregados, afectando com isso a interacção magnética entre os dois e concomitantemente a transferência electrónica na proteína. A diferença observada para a razão 3Fe/4Fe, de cerca de 1:2 através da RPE e 1:4 para a RMN, poderá residir no facto do potencial de redução da *Dd27Fd* ser bastante negativo; cerca de  $-500mV$ . Estes resultados (não publicados) foram obtidos no nosso laboratório, através de estudos de electroquímica, e demonstram ser difícil, o processo de redução completa da proteína, o que poderá explicar a divergência de resultados entre as duas técnicas espectroscópicas, nomeadamente uma

redução incompleta da proteína, que pela dupla integração do sinal de RPE, leva a resultados contraditórios.

Os espectros de RMN de próton do estado de  $Dd27Fd_{ox}$ , e por comparação com os de outras ferredoxinas referidas em VI.3.6. não deixam dúvida quanto ao tipo de agregado(s) coordenado à proteína. Estes mais uma vez se confirmam como uma "impressão digital" da ferredoxina em questão. A certeza não total no que respeita à atribuição específica das ressonâncias pertencentes aos prótons  $\beta-CH_2$  das cisteínas coordenantes, devida à falta de dados experimentais, como sejam espectros COSY e TOCSY e um melhoramento das condições experimentais para os espectros NOESY 2D, de forma a obter uma melhor resolução na zona diamagnética do espectro, torna-se de certa forma mais evidente e comprovada pelo estudo realizado para a dependência angular das ressonâncias paramagnéticas. O bom resultado deste ajuste, aponta este processo como uma ferramenta importante a ser utilizada para clarificar algumas ambiguidades na interpretação dos dados de RMN, nomeadamente na atribuição estereoespecífica das ressonâncias dos prótons  $\beta-CH_2$ . Estes resultados, juntamente com os resultados observados para outras proteínas de 8Fe referidas, parecem confirmar mais uma vez um comportamento geral para este tipo de proteínas em que o mecanismo de transferência de densidade de spin é essencialmente um mecanismo do tipo  $\pi$ .

No caso do estado reduzido, o espectro de RMN de próton apresenta não só um maior número de ressonâncias na zona paramagnética do mesmo, como ainda estas se encontram mais desviadas para campo baixo, devido ao aumento do paramagnetismo dos agregados metálicos apresentando agora, dependências com a temperatura do tipo *Curie* e *anti-Curie*, contrariamente ao estado oxidado, em que as ressonâncias paramagnéticas apresentam dependências com a temperatura do tipo *anti-Curie*, sendo este comportamento típico das ferredoxinas que contêm dois agregados [4Fe-4S]. Este comportamento revelou-se também de

extrema importância, no caso da  $Dd27Fd_{nat}$ . O facto da ressonância **a**, ter um tipo de comportamento *Curie* com a temperatura, levantou de imediato a hipótese de pertencer a um próton  $\beta\text{-CH}_2$  de uma cisteína coordenada a um agregado  $[3\text{Fe-4S}]$ .

## VI.5. Bibliografia

1. Liu, M. C., and Peck, H. D., Jr. (1981) *J.Biol.Chem.* **256**, 13159-13164
2. Edman, P., and Begg, G. (1967) *Eur. J. Biochem.* **1**, 80-91
3. Laursen, R. A. (1971) *Eur. J. Biochem.* **20**, 89-102
4. Fischer, D. S., and Price, D. C. (1964) *Clin. Chem.* **10**, 21-31
5. Vold, R. L., Waugh, J. S., Klein, M. P., and Phelps, D. E. (1968) *J.Chem.Phys.* **48**, 3831
6. Meyer, J., Moulis, J. M., Scherrer, N., Gagnon, J., and Ulrich, J. (1993) *Biochem.J.* **294**, 622-623
7. Hase, T., Matsubara, H., and Evans, M. C. W. (1977) *J.Biochem. (Tokyo)* **81**, 1745-1749
8. Scrofani, S. D. B., Brownlee, R. T. C., Sadek, M., and Wedd, A. G. (1995) *Inorg.Chem.* **34**, 3942-3952
9. Blanchard, L., Payan, F., Qian, M., Haser, R., Noailly, M., Bruschi, M., and Guerlesquin, F. (1993) *Biochim. Biophys.Acta* **1144**, 125-133
10. Macedo, A. L., Besson, S., Moreno, C., Fauque, G., Moura, J. J. G., and Moura, I. (1996) *Biochem.Biophys.Res.Com.* **229**, 524-530
11. Bruschi, M., and Hatchikian, C. E. (1982) *Biochimie* **64**, 503-507
12. Moura, J. J. G., Macedo, A. L., and Palma, P. N. (1994) in *Inorganic Microbial Sulfur Metabolism* (Peck, H. D., Jr.; LeGall, J., ed) Vol. 243, pp. 165-188, Academic Press, Inc., San Diego, CA.
13. Huynh, B. H., Moura, J. J. G., Moura, I., Kent, T. A., LeGall, J., Xavier, A. V., and Munck, E. (1980) *J.Biol.Chem.* **255**, 3242-3244
14. Huber, J. G., Gaillard, J., and Moulis, J.-M. (1995) *Biochemistry* **34**, 194-205
15. Bentrop, D., Bertini, I., Luchinat, C., Mendes, J., Piccioli, M., and Teixeira, M. (1996) *Eur. J.Biochem.* **236**, 92-99
16. Macedo, A. L., Palma, N., Moura, I., LeGall, J., Wray, V., and Moura, J. J. G. (1993) *Magn. Res. Chem.* **31**, S59-S67
17. Macedo, A. L., Moura, I., LeGall, J., Huynh, B., and Moura, J. J. G. (1993) *Inorganic Chemistry* **32**(7), 1101-1105

18. Macedo, A. L. (1994) Estudos estruturais em ferredoxinas. Aplicação de RMN multidimensional a sistemas paramagnéticos. Tese de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa
19. Bertini, I., Briganti, F., Luchinat, C., Messori, L., Monnanni, R., Scozzafava, A., and Vallini, G. (1992) *Eur.J.Biochem.* **204**, 831-839
20. Bertini, I., Capozzi, F., Luchinat, C., Piccioli, M., and Vila, A. J. (1994) *J.Am.Chem.Soc.* **116**, 651-660
21. Bertini, I., Briganti, F., Luchinat, C., and Scozzafava, A. (1989) *Inorg. Chem.* **29**, 1874-1880
22. Bertini, I., Donaire, A., Feinberg, B. A., Luchinat, C., Piccioli, M., and Yuan, H. (1995) *Eur.J.Biochem.* **232**, 192-205
23. Adman, E. T., Sieker, L. C., and Jensen, L. H. (1973) *J.Biol.Chem.* **248**, 3987-3996
24. Blanchard, L., Payan, F., Qian, M., Haser, R., Noailly, M., Bruschi, M., and Guerlesquin, F. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1144**, 125-133
25. Adman, E. T., Sieker, L. C., and Jensen, L. H. (1973) *J.Biol.Chem.* **248**, 3987
26. Mouesca, J. M., Rius, G., and Lamotte, B. (1993) *J.Am.Chem.Soc.* **115**, 4714-4731
27. Duée, E.D., Fanchon, E., Vicat, J., Sieker, L.C., Meyer, J., and Moulis, J.M. (1994) *J.Mol.Biol.* **243**, 683-695

## CAPÍTULO VII

### **Clonagem e sobre-expressão da ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas***

## **Clonagem e sobre-expressão da ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas*.**

VII.1. Introdução	173
VII.2. Materiais e métodos	173
VII.2.1. Clonagem do gene da ferredoxina II de <i>Desulfovibrio gigas</i> (Dg)	175
VII.2.2. Expressão da ferredoxina recombinante (DgFdII <sub>rec</sub> )	176
VII.2.3. Purificação da DgFdII <sub>rec</sub>	177
VII.3. Resultados - Caracterização da DgFdII <sub>rec</sub>	178
VII.3.1. Clonagem, Expressão e Purificação	178
VII.3.2. Electroforese em gel de poliacrilamida – Pureza da proteína	178
VII.3.3. Espectro de UV/Visível – Quantificação e pureza da proteína	180
VII.3.4. Estrutura terciária	182
VII.3.5. Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)	182
VII.3.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	183
VII.4. Conclusões	185
VII.5. Bibliografia	189

## VII.1. Introdução

Tendo em conta a quantidade de ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas* (DgFdII) obtida a partir de um crescimento de 300 L em reactor, a qual raramente ultrapassa os 20mg de proteína pura, e as dificuldades em termos temporais e monetários, especialmente no que visa à obtenção de amostras enriquecidas em  $^{57}\text{Fe}$ , optou-se pela realização e optimização de um sistema de expressão da proteína em *E.coli*. A proteína recombinante; DgFdII<sub>rec</sub>, foi posteriormente purificada, caracterizada espectroscopicamente e comparados os resultados com os já publicados para a DgFdII nativa. A clonagem e sobre-expressão da ferredoxina II de *D.gigas* tinha já sido previamente realizada por Chen e colaboradores em 1994 [1]. No entanto, problemas com a colónia relacionados provavelmente com o vector de clonagem – pUC18, levaram a uma nova clonagem da DgFdII no vector pT7-7.

## VII.2. Materiais e métodos

O vector pT7-7 foi generosamente cedido pelo Dr. Stan Tabor (Harvard Medical School). Os "primers" utilizados para amplificar o gene da ferredoxina de *Dg* foram sintetizados no "Molecular Biology Core Facility" na Mayo Clinic & Foundation. As estirpes de *Escherichia coli* (*E.coli*) DH5 $\alpha$  e BL21 (DE3) foram compradas à BRL e Novagen Inc. (Madison, WI) , respectivamente. Os marcadores de Peso Molecular (2.5-16.9 kDa), as resinas aniónicas DEAE-52 e Source-Q, o HiLoad 26/10 "Fast Flow column" e a coluna pré-empacotada Superdex 75 HR 10/30, foram adquiridas à Pharmacia Biotech Inc.

O DNA genómico foi isolado de *Dg* pela técnica descrita na bibliografia [2]. A purificação de DNA foi feita utilizando o sistema de purificação de DNA "Wizard<sup>TM</sup>



Minipreps e Maxipreps" da Promega Corp. USA, de acordo com as instruções do fabricante. A sequenciação de DNA foi realizada no "Molecular Biology Core Facility" na Mayo Clinic & Foundation utilizando o aparelho de sequenciação Applied Biosystems 373A, versão 1.2.2a2. Os espectros de UV/Visível foram registados a temperatura ambiente (Ta), utilizando um espectrofotómetro Shimadzu UV-265. A proteína, em todos os passos do esquema de isolamento e purificação foi concentrada utilizando uma unidade com uma célula agitadora da Amicon, equipada com uma membrana para Diaflow YM5 da Amicon, ou centricons Amicon com membranas de 5 kDa. As concentrações de proteína foram calculadas com  $\epsilon_{412nm}=15700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [3]. A estrutura terciária da *DgFdII<sub>rec</sub>* foi determinada com uma coluna pré-empacotada Superdex-75 HR 10/30, calibrada com padrões das seguintes proteínas: Rubredoxina (6 kDa), Ribonuclease (13.7 kDa), Quimiotripsina (25 kDa), Ovalbumina (43 kDa) e BSA (67 kDa).

Os espectros de RPE foram adquiridos num aparelho Bruker EMX 8/2.7, equipado com um criostato de fluxo contínuo da Oxford Instruments. As amostras foram preparadas com proteína pura com uma concentração de 100 $\mu\text{M}$ , em tampão fosfatos 100mM, pH 8.0. A redução das mesmas foi feita por adição de ditionito de sódio.

Os espectros de RMN de prótons foram obtidos em espectrómetros Bruker ARX de 400MHz e AMX de 600MHz, equipados com uma unidade de controlo de temperatura. Os valores de desvio químico são definidos em partes por milhão (ppm) relativamente ao 3-trimetilsilil-(2,2,3,3- $^2\text{H}_4$ ) propionato. Os valores positivos referem-se a desvios para campo baixo. As amostras foram preparadas com proteína pura, com uma concentração de 2mM e equilibrada com tampão fosfatos 100mM, pH 8.0 e permutadas com  $\text{D}_2\text{O}$  99.9% em centricons Amicon, com membranas de 5 kDa.

### VII.2.1. Clonagem do gene da ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas* (Dg)

O gene da DgFd foi clonado a partir de DNA genómico de *Dg*, utilizando a reacção em cadeia da polimerase (PCR) e dois "primers" oligonucleotídicos sintetizados de acordo com a última sequência publicada para a DgFd [1]. As sequências dos "primers" denominados FD2.3 e FD2.5 são respectivamente: 5'-TTAAGCTTCTGCAGTCGA-CTCAGGACCGAATGATCGC-3' e 5'-CCATGGATCCTCTAGAAGG-AGATATACATATGCCTATCG-3'.

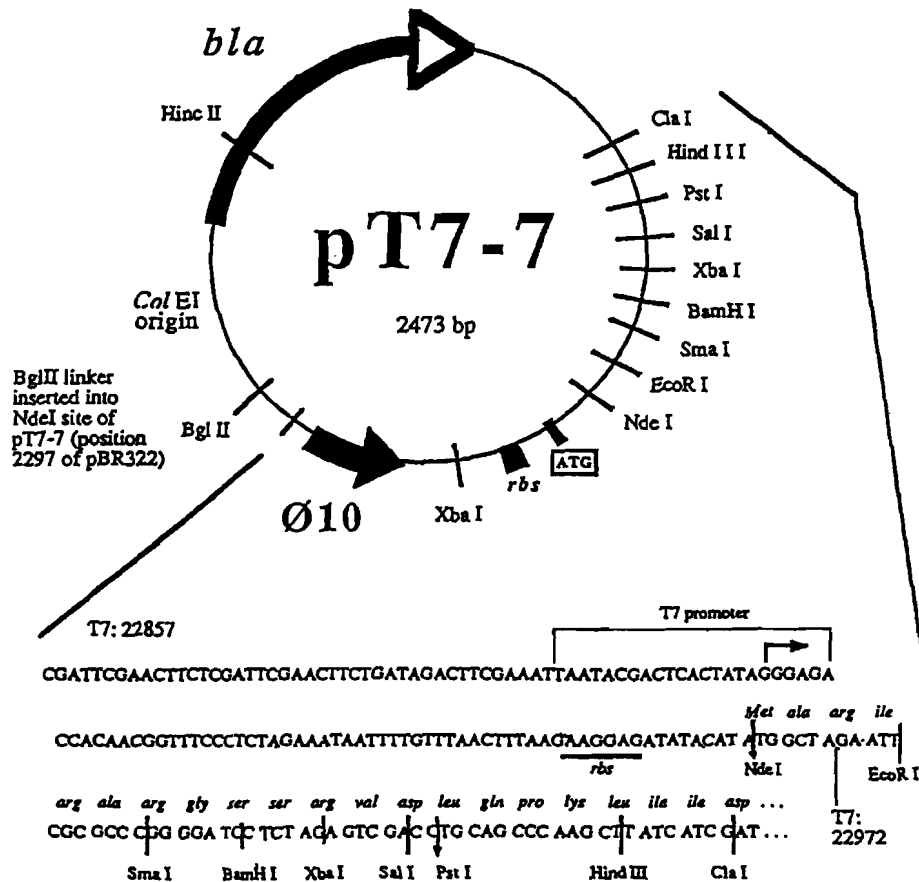


Figura VII.1. O vector pT7-7[4].

O passo de amplificação da PCR foi seguido pela purificação do fragmento de 228 pares de bases. Este fragmento foi posteriormente digerido com as enzimas de restrição NdeI e PstI, e clonado no vector pT7-7 [4], representado na Figura VII.1. com resistência à ampicilina, digerido similarmente. Uma estirpe de *E.coli* DH5 $\alpha$  foi então transformada com o vector recombinante, sendo os "clones" recombinantes submetidos a uma análise de digestão restritiva e a sequência completa do gene dos "clones" positivos, verificada por sequenciação de DNA.

### ***VII.2.2. Expressão da ferredoxina recombinante (DgFdII<sub>rec</sub>)***

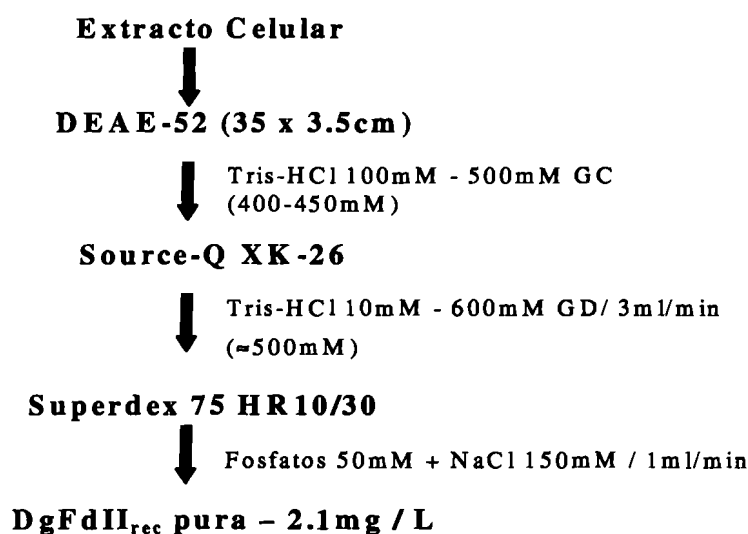
Após identificação de um "clone" positivo e posterior análise por sequenciação de DNA, o correspondente DNA plasmídico contendo o gene da ferredoxina de *Dg*, foi extraído, sendo os plasmídeos recombinantes transformados em células competentes BL21 (DE3) [5] , as quais contêm nos seus cromossomas um gene indutível da RNA polimerase do T7, onde a transcrição do promotor T7 é induzida pela presença do indutor isopropil- $\beta$ -tio-D-galactosídio (IPTG).

As células BL21 (DE3) contendo o plasmídio recombinante foram crescidas a 37°C em dois litros de meio Miller LB (Sigma), com 25mM de ampicilina, até uma absorvância de 0.8 a 595nm, momento em que foram adicionados 0.5mM de IPTG. Após 6H, as células foram centrifugadas a 3400xg, durante 15min. As células foram então suspensas em tampão Tris-HCl 100mM, pH 7.6 (cerca de 2.5 X peso celular), e lisadas num aparelho de pressão celular "French pressure" a 12000Psi. Posteriormente foi adicionado às células lisadas MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O ( para uma concentração final de 20mM) e DNaseI, de modo a destruir os

ácidos nucleicos e diminuir a viscosidade da solução. Seguiu-se uma etapa de centrifugação a 39000xg, durante 30min, de forma a obter o extracto celular.

### VII.2.3. Purificação da $DgFdII_{rec}$

A purificação da  $DgFdII_{rec}$  é efectuada em várias etapas, descritas na Figura VII.2. Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4°C, encontrando-se todos os tampões utilizados a pH 7.6.



**Figura VII.2.** Esquema geral da purificação da ferredoxina II recombinante de *Dg* ( $DgFdII_{rec}$ ). Os tampões indicados referem-se aos tampões de eluição das colunas. GC—Gradiente Contínuo GD—Gradiente Descontínuo.

### **VII.3. Resultados - Caracterização da *DgFdII<sub>rec</sub>***

#### ***VII.3.1. Clonagem, Expressão e Purificação***

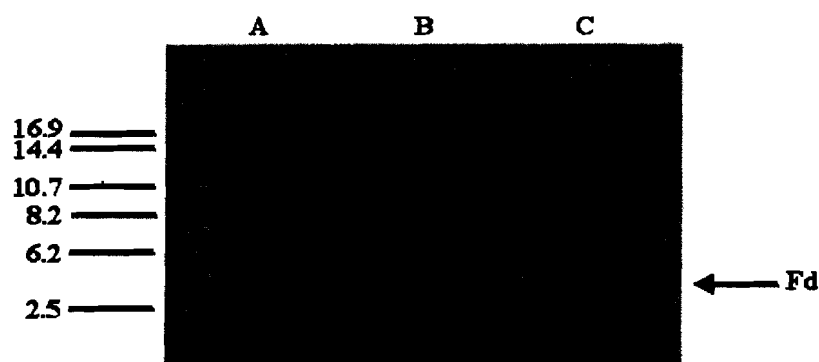
O gene da ferredoxina de *Dg* foi clonado no vector pT7-7, utilizando a técnica de PCR os dois "primers" FD2.3 e FD2.5, homólogos aos terminais opostos do gene. A Sequência de DNA é a mesma da apresentada na Figura II.1., formando uma cadeia polipeptídica de 58 resíduos de amino ácidos com uma massa molecular de aproximadamente 6.3 kDa. A proteína foi expressa, através da regulação do promotor *lac*, induzido pelo IPTG, em células de *E.coli* BL21 (DE3). As condições experimentais foram optimizadas com os valores descritos na secção VII.2.2. A purificação da *DgFdII<sub>rec</sub>*, com uma quantidade de 2.1mg de proteína pura por litro de cultura, tem um rendimento 50 vezes superior à quantidade obtida com células de *Dg*.

#### ***VII.3.2. Electroforese em gel de poliacrilamida – Pureza da proteína***

A electroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, permite verificar a homogeneidade da solução de proteína purificada, assim como estimar a sua massa molecular, por comparação com padrões de massa molecular conhecida, e a presença ou não de subunidades. A vantagem da utilização de um gel de poliacrilamida na presença de SDS (condições desnaturantes) em relação a um gel nativo (sem SDS) consiste na obtenção de uma carga homogénea e igual para todas as proteínas. A interacção da proteína com o SDS (detergente aniónico que se liga fortemente à proteína) destrói as ligações não covalentes, originando a desnaturação da proteína e impondo uma carga negativa ao complexo resultante.

Deste modo, a mobilidade electroforética do complexo proteína-detergente é apenas uma função da sua massa molecular e não da sua carga [6,7]. A utilização de um gel nativo de poliacrilamida é adequada para detectar proteínas com massa molecular semelhante mas diferente composição de resíduos de amino ácidos. No entanto, relativamente às ferredoxinas e à migração peculiar que apresentam em géis de SDS, devido ao baixo ponto isoeléctrico, nada podemos afirmar relativamente ao peso molecular destas proteínas, utilizando esta técnica. Assim este método, no caso em questão, serve apenas para controlar o grau de pureza das proteínas.

No final da purificação da  $DgFdII_{rec}$ , realizou-se uma electroforese em gel de 17.5% poliacrilamida/SDS das proteínas recombinante e nativa, juntamente com padrões de massa molecular conhecida (secção VII.2.) para controlo. Este gel é apresentado na Figura VII.3, na qual podemos observar que ambas as proteínas se encontram puras e possuem o mesmo peso molecular por monómero.



**Figura VII.3.** Gel de 17.5% poliacrilamida/SDS (corado com azul de Coomassie) de ambos os estados oxidados da  $DgFdII_{nat}$  e  $DgFdII_{rec}$ . A - Marcadores de peso molecular, B -  $DgFdII_{rec}$  pura (estado oxidado), C- $DgFdII_{nat}$  pura (estados oxidado)

### VII.3.3. Espectro de UV/Visível – Quantificação e pureza da proteína

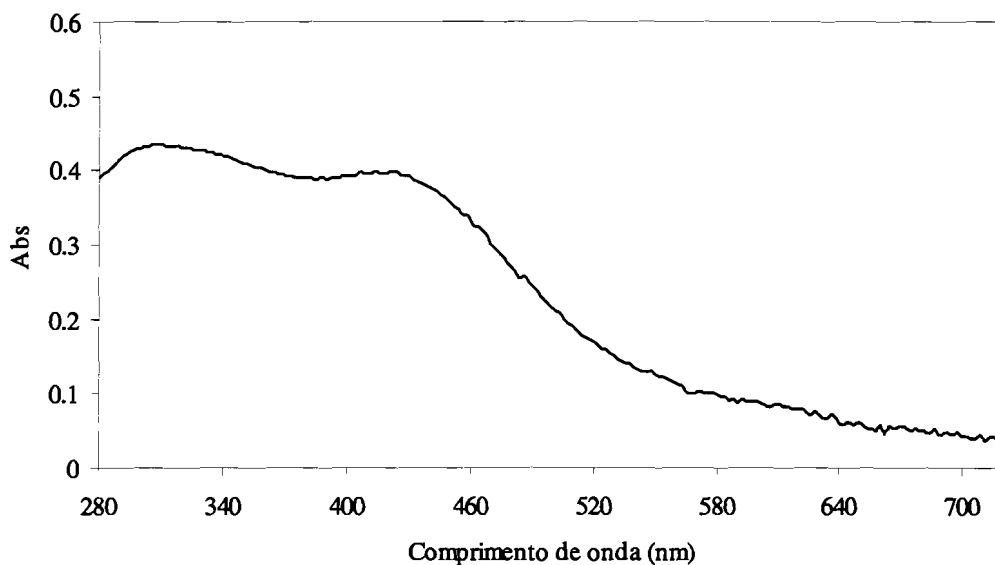
Cada proteína tem um espectro característico de UV/Visível, sendo este tipo de espectroscopia um processo rápido de verificar a proteína que se pretende purificar, desde que o seu espectro seja conhecido. Este método permite ainda determinar o coeficiente de pureza e a concentração da proteína em questão.

A absorvância a 280nm é típica de todas as proteínas e originada pela presença de resíduos aromáticos de tirosina, triptofano e fenilalanina, com excepção do caso de a proteína conter grupos prostéticos que também absorvam na região do ultra-violeta [8,9].

As ferredoxinas têm ainda bandas de transferência de carga características à volta dos 300 e 400nm, podendo estes valores variar ligeiramente de proteína para proteína. No caso da ferredoxina II de *Dg*, esta apresenta duas bandas características a cerca de 305 e 415nm [3]. Pode-se assim, ao longo das várias etapas de purificação, determinar o coeficiente de pureza da *DgFdII<sub>rec</sub>* por espectroscopia de UV/Visível. Este é definido como a razão  $Abs_{415nm}/Abs_{305nm}$ , que para a *DgFdII* considerada pura é igual ou superior a 0.68 [3].

A espectroscopia de UV/Visível permite ainda determinar a quantidade de proteína, requerendo o conhecimento do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) da proteína em causa. Para a *DgFdII*, o valor de  $\epsilon$  é de  $15700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para a banda a 415nm. Este método de determinação da quantidade de proteína é bastante rápido, não destrutivo para a proteína, sendo a sua concentração directamente proporcional à absorvância (Lei de Lambert-Beer;  $Abs = \epsilon bc$  em que  $Abs$  é o valor da absorvância a um dado comprimento de onda,  $\epsilon$  o coeficiente de extinção molar a esse comprimento de onda,  $b$  o percurso óptico e  $c$  a concentração da proteína). Na Figura VII.4. pode-se observar o espectro de UV/Visível da *DgFdII<sub>rec</sub>*, o qual apresenta duas bandas de transferência de carga a 305 e 412nm, muito idêntico ao da

*DgFdII<sub>nat</sub>*, com um coeficiente de pureza  $A_{412\text{nm}}/A_{305\text{nm}}$  de 0.8, demonstrativo da pureza da proteína.



**Figura VII.4.** Espectro de absorção UV/Visível do estado oxidado da *DgFdII<sub>rec</sub>*. A proteína encontra-se dissolvida em tampão fosfatos 50mM, pH 7.6 + 150mM NaCl.  $A_{412\text{nm}}/A_{305\text{nm}} = 0.8$ .

Com base no valor do coeficiente de extinção molar da *DgFdII<sub>nat</sub>* e do valor da absorvância a 412nm foi possível determinar que no final da purificação se obtiveram 4.2mg de proteína pura (2.1mg/litro de crescimento).



### ***VII.3.4 Estrutura terciária***

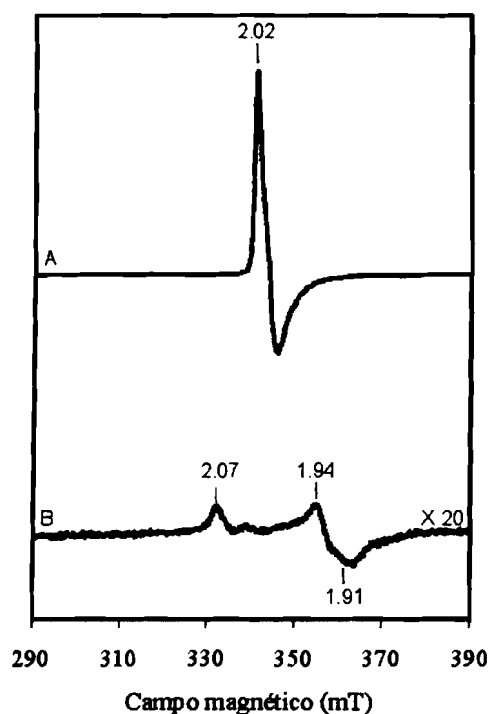
A determinação da massa molecular da proteína recombinante ( $DgFdII_{rec}$ ), realizada segundo a técnica descrita na secção VII.2., revela uma estrutura terciária dimerica com um peso molecular total por volta dos 13kDa ( $\approx 2 \times 6.3kDa$ ), tal como a  $DgFdII_{nat}$  após redução [10], a qual no estado oxidado (nativo) é um tetrâmero, com um peso molecular total de cerca de 26kDa ( $\approx 4 \times 6.3kDa$ ) [3,11].

### ***VII.3.5. Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)***

O espectro de RPE a baixa temperatura (12K) da  $DgFdII_{rec}$  apresenta um sinal característico de RPE de um centro [3Fe-4S] no estado oxidado com um valor de g de 2.02 [11,12].

No estado totalmente reduzido esta espécie torna-se silenciosa em RPE e aparece um sinal rômboico muito menos intenso, com valores de g de 2.07, 1.94 e 1.91, característico de um centro [4Fe-4S] no estado reduzido +1, com  $S=1/2$ , o qual permanece silencioso em RPE no estado oxidado +2, com  $S=0$  [11]. A dupla integração do espectro da  $DgFdII_{rec}$  no estado oxidado apresenta um valor de 1.08 spins por monómero, quando comparada com uma amostra de  $DgFdII_{nat}$  utilizada como padrão. Um quociente  $[3Fe-4S]/[4Fe-4S] \approx 1000$  é obtido por comparação de ambos os espectros dos estados oxidado e reduzido. Este valor indica que a presença de um centro [4Fe-4S] é meramente residual.

Os espectros de RPE dos estados oxidados e reduzido da  $DgFdII_{rec}$  são apresentados na Figura VII.5.

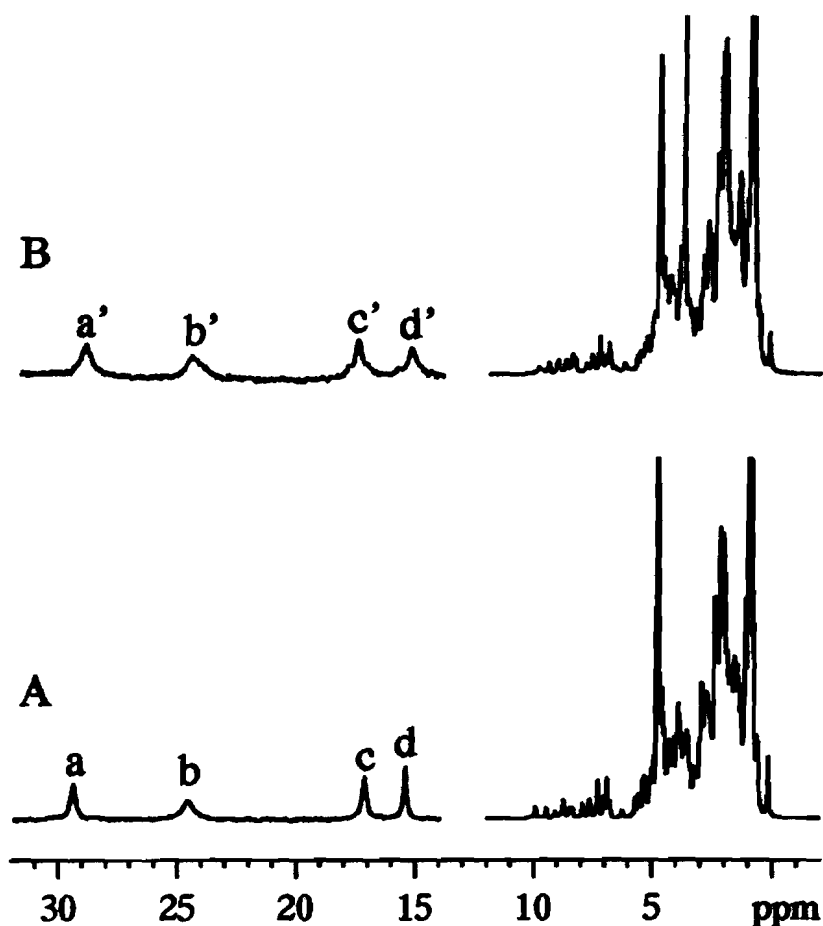


**Figura VII.5.** Espectro de RPE da  $DgFdII_{rec}$ . A – Estado oxidado B – Estado reduzido por adição de ditionito de sódio (multiplicado por um factor 20). Os espectros foram adquiridos a uma temperatura de 12K; ganho de  $20 \times 10^3$ ; amplitude de modulação de 4.06Gpp; frequência de 9.66GHz e potência de 0.63mW.

### III.3.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de próton dos estados oxidados da  $DgFdII_{nat}$  e  $DgFdII_{rec}$  são apresentados na Figura VII.6. De uma maneira geral podemos verificar que os espectros são bastante semelhantes. As quatro ressonâncias largas a campo baixo, designadas **a**, **b**, **c** e **d** para  $DgFdII_{nat}$  no estado oxidado, estão presentes na proteína recombinante, designadas por **a'**, **b'**, **c'** e **d'** com valores de desvio químico praticamente iguais. Estas ressonâncias foram já previamente atribuídas aos prótons  $\beta$ -CH<sub>2</sub> das três cisteínas que coordenam o agregado [3Fe-4S]: Cys 50, Cys 14 e Cys 8 [13]. São, no entanto encontradas diferenças no que respeita às

larguras de linha das quatro ressonâncias. Para a proteína nativa, valores de largura de linha de 150, 292, 140 e 97Hz são característicos dos picos **a,b,c,d**, enquanto os picos **a',b',c',d'** da proteína recombinante apresentam larguras de linha de 280, 420, 208, e 212Hz, respectivamente.



**Figura VII.6.** Espectro completo de RMN de próton a 600MHz (com supressão do pico da água). Expansão da região a campo baixo de ambos os estados oxidados da *DgFdII* nativa e recombinante. A – Estado oxidado da *DgFdII*<sub>nat</sub>. B – Estado oxidado da *DgFdII*<sub>rec</sub>. As ressonâncias estão designadas **a-d** para a proteína nativa e **a'-d'** para a recombinante a partir da região a campo baixo expandida.

## VII.4. Conclusões

Apesar de se ter conseguido expressar a ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas* numa cultura de *E.coli* crescida aerobiamente, a quantidade de proteína obtida (2.1mg/L) não é de forma alguma a ideal para se considerar este sistema de expressão, um sistema com êxito. Este relativamente baixo nível de expressão pode dever-se a uma série de factores. Uma das hipóteses a considerar será a possibilidade da proteína recombinante ser muito mais sensível ao oxigénio do que a nativa, com uma concomitante perda do agregado durante o processo de purificação, realizado em condições aeróbias. Este pressuposto baseia-se no espectro de RMN de protão das duas proteínas (Figura VII.6.), em que facilmente pode observar-se que as quatro ressonâncias paramagnéticas **a'-d'**, além de possuírem desvios químicos ligeiramente diferentes, têm também larguras de linha muito maiores, comparativamente com as respectivas ressonâncias **a-d**, pertencentes à proteína nativa. Estas observações levam a pensar que as proteínas recombinante e nativa devem certamente possuir diferentes arranjos estruturais tridimensionais, factor este que pode ser responsável pela maior sensibilidade da *DgFdII<sub>rec</sub>* relativamente ao oxigénio. Pode também referir-se este tipo de comportamento, no caso da purificação da proteína nativa de *DgFdII*, em que uma outra forma de proteína contendo um agregado [3Fe-4S] é identificada, sendo no entanto obtida em muito menores quantidades. Referimo-nos à ferredoxina II' de *Desulfovibrio gigas*; *DgFdII'* [3]. Estudos recentes realizados revelam não só que esta proteína é um dímero [14], como a *DgFdII<sub>rec</sub>*, mas também que as correspondentes ressonâncias do espectro de RMN de protão, situadas no envelope paramagnético a campo mais baixo (**a'-d'**) são ligeiramente mais alargadas (como na proteína recombinante), que as da *DgFdII<sub>nat</sub>* [14]. Sendo o processo de purificação das proteínas *DgFdII<sub>nat</sub>* e *DgFdII<sub>rec</sub>* completamente realizado sobre condições aeróbias, poderá ser esta uma das razões que explique a obtenção de uma pequena quantidade destas proteínas, que

como já se referiu anteriormente, diferem estruturalmente da  $DgFdII_{nat}$ . Uma análise da quantidade de proteína durante os diferentes passos do processo de purificação, demonstra também uma perda do agregado da proteína ao longo dos mesmos. Outro factor a ter em conta, relaciona-se com as condições de crescimento das células de *E.coli*. Nos diferentes ensaios, feitos por vezes em diferentes condições de fornecimento de oxigénio, pudemos concluir que a formação da proteína  $DgFdII_{rec}$  é altamente favorecida num meio de crescimento fortemente oxigenado, facto este já observado anteriormente [1], no qual se verifica que em células de *E.coli* crescidas em anaerobiose, apesar do nível de apoproteína recombinante ser o mesmo do que em culturas crescidas com fornecimento de oxigénio, o nível de incorporação do agregado revelava-se muito baixo, em parte devido talvez à incapacidade de formação de pontes dissulfureto em condições redutoras. Verifica-se ainda, com estudos de RPE, que nas condições de crescimento menos favoráveis, a pouca quantidade de proteína formada é praticamente na sua totalidade  $DgFdII$ , sendo somente obtida uma ínfima quantidade de proteína que contém um agregado  $[4Fe-4S]$ .

De forma a analisar a possibilidade de reconstituição da apoproteína formada pela perda do agregado durante o processo de purificação, foram realizados vários estudos *in vitro* de reconstituição de proteína sobre diferentes concentrações de  $Fe^{+2}$ , analisados por técnicas de RPE [14]. Os resultados traduzem a capacidade da apoproteína para incorporar os dois diferentes tipos de agregado;  $[3Fe-4S]$  e  $[4Fe-4S]$ , relativamente à quantidade de ferro adicionada. Deve-se ter ainda presente que estas duas proteínas formadas são formas oligoméricas, diferindo somente no tipo de agregado presente e estrutura terciária [3,10,11]. Como resultado, observa-se que a quantidade de proteína formada contendo o centro  $[4Fe-4S]$  é sempre superior em cerca de 2.5 vezes à proteína que contém o centro  $[3Fe-4S]$ . Isto leva a concluir-se, que a reconstituição da apoproteína não parece ser a solução ideal de forma a obter uma maior quantidade da  $DgFdII_{rec}$ . Estes resultados, foram também previamente

reproduzidos e monitorizados anteriormente através de técnicas de RMN [15]. Ao seguir-se o ciclo redox da  $DgFdII_{nat}$  por espectroscopia de RMN de próton, sempre que se adicionava ditionito de sódio à proteína, na ausência de oxigénio, a proteína contendo o agregado [4Fe-4S] começava a formar-se, revelando assim a melhor capacidade relativamente à formação da  $DgFdII$ , sobre condições redutoras, nas quais o processo de formação de pontes dissulfureto é bastante difícil (é ainda de relembrar que a existência de uma ponte dissulfureto na  $DgFdI$  é bastante incerta [16]).

**Tabela III.1.** Breve caracterização da ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas* recombinante ( $DgFdII_{rec}$ )

Ferredoxina II de <i>Desulfovibrio gigas</i> recombinante ( $DgFdII_{rec}$ ) Estado oxidado	
Tipo de centro	[3Fe-4S]
Massa molar (kDa)	6.3 kDa
Estrutura terciária	Dímero
Espectroscopia UV/Visível	Duas bandas de transferência de carga a 305 e 412nm Coeficiente de pureza $A_{412nm}/A_{305nm} = 0.8$
RPE	Sinal isotrópico a $g=2.02$
RMN	Quatro ressonâncias a 29.0, 24.5, 17.6 e 15.2 ppm (300 K)

Uma análise conjunta dos resultados obtidos, revela-nos que a  $DgFdII_{rec}$  não apresenta exactamente as mesmas características espectrais, nomeadamente as de RMN, que a

*DgFdII<sub>nat</sub>*. Pode-se, no entanto afirmar com uma grande certeza que ambas as proteínas recombinante e nativa são "a mesma" proteína.

A existência de um sistema de expressão otimizado, traduzido num elevado nível de expressão da proteína recombinante seria sem dúvida de grande interesse, permitindo o fornecimento de proteína em larga escala, de uma forma mais rápida e a mais baixo custo, especialmente para obtenção de amostras enriquecidas em  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$  necessárias respectivamente para estudos de Mössbauer e determinação da estrutura em solução.

## VII.5.Bibliografia

1. Chen, B., Menon, N. K., Dervertanian, L., Moura, J. J. G., and Przybyla, A. E. (1994) *FEBS Letters* **351**, 401-404
2. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1982) *Molecular Cloning*, 1st edn., Cold Spring Harbour Laboratory Press.
3. Bruschi, M., Hatchikian, C., LeGall, J., Moura, J. J. G., and Xavier, A. V. (1976) *Biochem. Biophys. Acta* **449**, 275-284
4. Tabor, S. (1990) in *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. M. B., R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D., Seidman, J.G.; Smith, J.A. and Struhl, K. eds., ed), pp. 16.2.1 - 16.2.11, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York
5. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990) in *Methods Enzymology*. Vol. 185, pp. 60-89
6. Garfin, D. E. (1990) in *Methods of enzymology* (Deutscher, M. P., ed) Vol. 182, pp. 423-441, Academic Press
7. Scopes, R. K. (1982) in *Protein purification - Principles and practice* (Cantor, C. R., ed), pp. 245-259, Springer-Verlag, Germany
8. Kendrick, M. J., May, M. T., Plishka, M. J., and Robinson, K. D. (1992) in *Metals in biological systems*, pp. 91, Ellis Horwood Limited, England
9. Mathews, C. K., and van Holde, K. E. (1990) in *Biochemistry*, pp. 207, The Benjamin/Cummings Publishing Company, USA
10. Macedo, A. L., and Moura, J. J. G. *resultados não publicados*
11. Moura, J. J. G., Macedo, A. L., and Palma, P. N. (1994) in *Inorganic Microbial Sulfur Metabolism* (Peck, H. D., Jr.; LeGall, J., ed) Vol. 243, pp. 165-188, Academic Press, Inc., San Diego, CA.
12. Huynh, B. H., Moura, J. J. G., Moura, I., Kent, T. A., LeGall, J., Xavier, A. V., and Munck, E. (1980) *J.Biol.Chem.* **255**, 3242-3244
13. Macedo, A. L., Palma, N., Moura, I., LeGall, J., Wray, V., and Moura, J. J. G. (1993) *Magn. Res. Chem.* **31**, S59-S67
14. Rodrigues, P., Macedo, A. L., and Moura, J. J. G. *resultados não publicados*
15. Macedo, A. L., Moura, I., Surerus, K. K., Papaefthymiou, V., Liu, M., LeGall, J., Münck, E., and Moura, J. J. G. (1994) *J.Biol.Chem.* **269**(11), 8052-8058



16. Moura, J. J. G., Moura, I., Kent, T. A., Lipscomb, J. D., Huynh, B. H., LeGall, J., Xavier, A. V., and Münck, E. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 6259-6267

## **Apêndice A**

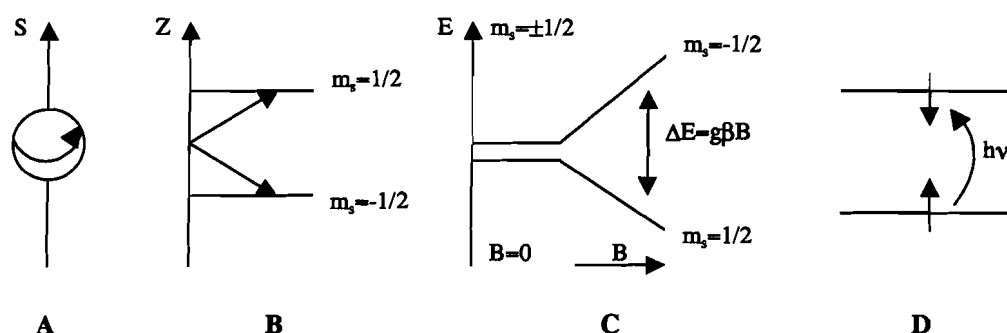
### **A Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE)**

## A Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE) [1-5]

A espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica, baseia-se fundamentalmente nas propriedades magnéticas dos electrões. Esta técnica tem sido largamente aplicada a sistemas biológicos, nomeadamente a metaloproteínas desde 1960, no entanto somente sistemas possuindo electrões desemparelhados (sistemas paramagnéticos) são activos ou observáveis por RPE, com uma maior facilidade de detecção para sistemas de spin semi-inteiro.

O electrão possui um momento angular intrínseco – o momento angular de spin – que é caracterizado pelo número quântico de spin –  $s$  – que tem o valor de  $1/2$ , originado pelo seu próprio movimento de rotação. Sendo o electrão uma carga negativa que gira em torno de si mesmo, vai gerar um campo magnético, pelo que ao momento angular de spin vai estar associado um momento magnético  $\mu$ . Na ausência de um campo magnético externo, o momento magnético electrónico, vai orientar-se aleatoriamente, sendo os níveis de energia correspondentes às duas possíveis orientações segundo o eixo dos  $z$  –  $\mu_z = \pm 1/2 \beta g_e$  ( dois valores do momento quântico  $m_s = \pm 1/2$  ) degenerados, isto é, têm a mesma energia (Figura A.1.), em que  $\beta$  é uma constante, o magnetão de Bohr, e  $g_e$  é designado por factor  $g$ , que para um electrão terá o valor de  $g_e = 2.0023$ , e que é um dos parâmetros principais em RPE. Contudo, recorrendo a um campo magnético externo estático,  $B$ , é possível remover a degenerescência destes níveis de energia, podendo assim ocorrer absorção efectiva de energia. Para um spin de  $1/2$ , os dois níveis de energia produzidos pela interacção do momento magnético electrónico com um campo magnético externo, denominada energia de interacção de Zeeman, diferem de  $\Delta E = g_e \beta B_0$ , em que  $B_0$  é o campo magnético aplicado, podendo ser facilmente verificado que esta diferença de energia aumenta linearmente com a intensidade deste (Figura A.1.). Ao nível de energia superior corresponde um alinhamento antiparalelo de

uz com o campo **B** e ao nível de energia inferior um alinhamento paralelo. Para se induzirem transições entre estes dois níveis de energia será agora necessário aplicar uma radiação electromagnética (na gama de frequência das micro-ondas) perpendicular ao campo magnético externo. A frequência desta radiação deve, no entanto, obedecer à condição  $h\nu = \Delta E = g_e\beta B_0$  (para  $B_0 \sim 3$  kGauss,  $\nu \sim 9$  GHz). Esta transição constitui a base fundamental da espectroscopia de RPE, pelo que esta consiste assim na mudança de orientação do spin do electrão na presença de um campo magnético estático, induzida por uma radiação electromagnética.



**Figura A.1.** A – Analogia clássica do spin electrónico, como um movimento de rotação do electrão em torno de si mesmo. B – Orientações possíveis do spin electrónico. C – Desdobramento dos níveis de energia de spin electrónico na presença de um campo magnético externo estático. D – Experiência de RPE.

Na prática, o que se faz, é variar o campo magnético **B** até ser atingida a condição de ressonância:  $B_r = h\nu/g_e\beta$ . O espectro de RPE consistiria numa linha de absorção de energia de microondas ao valor de campo  $B_r$ . Devido aos processos electrónicos de detecção do sinal, o espectro de RPE aparece geralmente com uma forma semelhante à da primeira derivada da curva de absorção; o valor do campo de ressonância é determinado pelo ponto de encontro da curva derivada com a linha de base ( derivada nula no ponto de máxima absorção). Por esta

razão, aparecem num espectro de RPE "picos positivos" ( acima da linha da base ) e "picos negativos" ( abaixo da linha de base ). Existem, no entanto, uma série de factores que provocam o alargamento da linha espectral, dentro dos quais se podem citar os processos de relaxação, que afectam os tempos de vida dos estados excitados, a homogeneidade e o estado físico da amostra, pelo que na realidade o espectro de RPE consiste de facto numa banda de absorção centrada em  $B_r$ . De entre os parâmetros que caracterizam o sinal obtido, salientam-se:

**Factor g.** O valor g caracteriza a posição da linha, sendo uma medida dos campos magnéticos locais, sentidos pelo electrão desemparelhado (acoplamento spin-órbita):

$$g = h\nu/\beta B_{ef} = 0.7144 \nu \text{ (GHz)} / B_{ef} \text{ (kG)}$$

em que  $B_{ef} = B_0 + B_{loc}$ . O campo magnético local,  $B_{loc}$ , é produzido pelo momento angular orbital adicional, no caso de metais de transição em que o electrão ocupa a camada  $d$ , ou pela vizinhança de núcleos que possuem um momento magnético próprio ( $^{14}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ). Este campo magnético pode reforçar ou enfraquecer o campo externo,  $B_0$ , definindo assim o campo efectivo,  $B_{ef}$ . Quanto mais forte for o acoplamento spin-órbita mais o valor de g se afasta do valor de  $g_e$ , característico do electrão livre. Sendo este acoplamento particularmente forte em iões de metais de transição, dá origem a sinais de RPE com valores de g muito diferentes de  $g_e$ .

**Estrutura hiperfina.** A estrutura hiperfina resulta da interacção do spin electrónico com o spin nuclear de átomos vizinhos, que apresentam um momento magnético nuclear  $I$ , não nulo. Daqui resulta o desdobramento dos estados energéticos do spin electrónico em  $2nI+1$  linhas ( $n$  é número de núcleos equivalentes), afastadas entre si do valor da constante de interacção hiperfina,  $A$ . Esta interacção pode ser anisotrópica, ou seja, os seus valores variarem com a orientação da molécula no campo magnético externo.

**Largura de linha.** Este parâmetro fornece informação acerca dos processos de relaxação do sistema.

### **Sistemas de spin activos em RPE**

Apenas sistemas com electrões desemparelhados ou paramagnéticos são activos em RPE, uma vez que esta técnica espectroscópica pressupõe a existência de um momento magnético efectivo no sistema em estudo. Este facto constitui uma das suas grandes vantagens, uma vez que numa amostra biológica complexa, apenas uma ínfima fracção é observável, o que lhe confere uma extrema especificidade.

Dentro dos sistemas paramagnéticos em Biologia, dois dos mais importantes são:

- i) sistemas radicalares, que contêm em geral apenas um electrão desemparelhado, de que são exemplos as quinonas, flavinas, diversos cofactores e alguns amino ácidos
- ii) iões metálicos, simples ou em agregados polimetálicos, contendo um ou mais electrões desemparelhados onde se incluem as metaloproteínas que contêm metais de transição como o vanádio, manganês, ferro, cobalto, níquel, cobre, molibdénio ou tungsténio.

Um espectro de RPE pode ser descrito por uma série de interacções magnéticas entre o momento angular de spin do electrão desemparelhado e a sua vizinhança, para além da interacção com o campo magnético aplicado, tais como:

- interacção do momento angular de spin com o momento angular orbital-**acoplamento spin-órbita.**
- **interacção spin-spin electrónico.**
- interacção do momento angular de spin electrónico com o momento angular de spin nuclear-**interacção nuclear hiperfina e superfina.**

É a interpretação das características do espectro com base nestas interacções que torna a espectroscopia de RPE particularmente útil no estudo e identificação de centros paramagnéticos, permitindo obter informações detalhadas sobre a estrutura e configuração electrónica do centro paramagnético, uma vez que o comportamento dos electrões na presença de um campo magnético externo, depende não só do átomo a que se encontram directamente ligados, como ainda dos núcleos e electrões desemparelhados que se encontram na vizinhança deste.

### **Acoplamento spin-órbita**

Como já foi referido, quando se aplica um campo externo,  $B_0$  a um electrão desemparelhado, o campo que de facto actua sobre o electrão é diferente de  $B_0$ . Este efeito é como que esteja incorporado no factor  $g$ , escrevendo-se a condição de ressonância como  $h\nu = g\beta B_0$  com  $g \neq g_e$ , ou seja  $h\nu = g_e\beta (g/g_e B_0)$ , o que permite dizer que o electrão está sujeito a um campo efectivo  $B_{ef} = (g/g_e)B_0$ . Como o valor de  $g$  que na realidade se observa varia de espécie para espécie, e é independente das condições experimentais utilizadas, os sinais de RPE são caracterizados pelos valores de  $g$  a eles associados, determinados pela equação  $g = h\nu/\beta B$ . O valor de  $g$  afasta-se tanto mais do valor de  $g_e$  quanto mais forte for o acoplamento spin-órbita. Esta interacção depende do tipo de orbital atómica em que se encontra o electrão e da massa nuclear. Na maioria dos sistemas biológicos, o electrão encontra-se em átomos leves, sendo o valor de  $g$  próximo de  $g_e$ . Pelo contrário, o acoplamento spin-órbita é particularmente forte em iões de metais de transição, que podem dar origem a sinais de RPE com valores de  $g$  muito diferentes dos valores de  $g_e$ . Devido ao acoplamento spin-órbita, o factor  $g$  adquire uma outra característica; a de ser anisotrópica, o que significa que o seu valor varia conforme a orientação da molécula em relação ao campo aplicado  $B_0$ . O valor de  $g$  é então caracterizado por três termos,  $g_{xx}$ ,  $g_{yy}$  e  $g_{zz}$ , quando o campo externo é

aplicado segundo os eixos moleculares x, y ou z. O espectro de RPE depende assim, da simetria do centro paramagnético e do estado físico da amostra. No caso das amostras geladas, como são o caso das amostras de metaloproteínas utilizadas, o sinal de RPE consiste na sobreposição de múltiplos espectros, correspondentes às diferentes orientações em relação ao campo aplicado, e logo aos diferentes valores de g. A forma do espectro obtido, pode dividir-se em três tipos: i) isotrópico, em que  $g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$ , ii) axial, em que os eixos x e y são equivalentes  $g_{xx} = g_{yy} = g_{\parallel}$  e  $g_{zz} = g_{\perp}$ , e iii) rômboico,  $g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$ .

O valor de g e o tipo de sinal permitem retirar importantes informações sobre o sistema em estudo, com a particularidade de ser possível identificar o centro paramagnético, os seus estados de spin e oxidação e determinar ainda alguns dados estruturais, funcionando esta técnica como que uma "impressão digital" do sistema em causa.

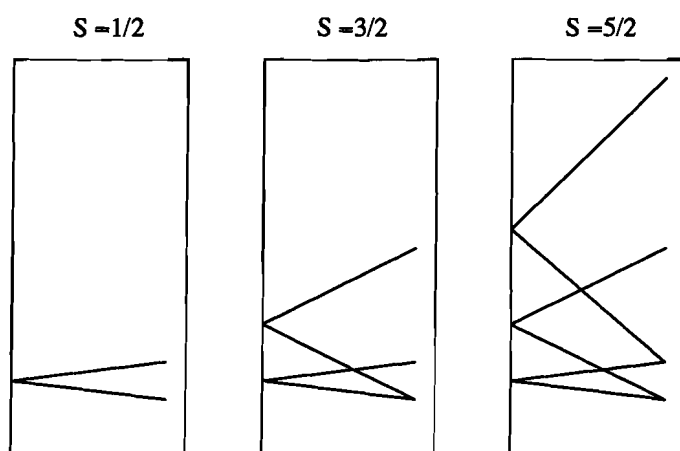
### **Interacção spin-spin**

Considerando agora sistemas paramagnéticos com vários electrões desemparelhados, como sejam sistemas contendo iões de metais de transição, verifica-se que a análise detalhada destes é bastante mais complexa. A existência de vários electrões desemparelhados, confinados à mesma região do espaço, leva a uma forte interacção entre os seus momentos magnéticos de spin, que tem como consequência o desdobramento dos vários estados de spin-electrónico – desdobramento a campo zero (ZFS). O tipo de desdobramento observado depende do número de electrões desemparelhados. Para estes sistemas, define-se um número quântico de spin total, igual à soma dos spins dos vários electrões desemparelhados,  $S = n \times 1/2$ , pelo que  $M_s$  pode, então, tomar valores de S, S+1, S-1, +S, ou seja, para um dado valor de S existem 2S+1 valores possíveis de  $M_s$  (Ex: para S=5/2, ter-se-á  $M_s = \pm 1/2, \pm 3/2, \pm 5/2$ ). Os vários sistemas de spin podem, segundo o teorema de Kramers, dividir-se em dois grupos:



- Sistemas com um número ímpar de electrões (spin total semi-inteiro), nos quais o desdobramento a campo zero leva ao aparecimento de estados de spin pelo menos duplamente degenerados e designados por doubletos de Kramers (Figura A.2.).

- Sistemas com um número par de electrões (spin total inteiro), nos quais a degenerescência dos níveis de spin pode ser completamente removida por desdobramento a campo zero.



**Figura A.2.** Diagrama de desdobramento a campo zero para vários estados de spin semi-inteiro.

Para sistemas de spin semi-inteiro em geral é possível observar sinais de RPE, sendo o número de transições dependente de ZFS. Quando este valor é pequeno, a regra de selecção  $\Delta M_s = \pm 1$  mantém-se e são observadas transições entre os doubletos de Kramers. Quando o ZFS é forte, a energia da radiação de micro-ondas pode ser demasiado pequena para permitir a transição entre os doubletos de Kramers, sendo apenas observadas transições dentro dos doubletos. Deste modo observam-se menos transições que no caso anterior.

Para sistemas com spin inteiro só são observadas transições entre os vários estados de spin, desde que o valor de ZFS seja pequeno quando comparado com a energia da radiação de micro-ondas utilizada.

### **Interacção nuclear hiperfina**

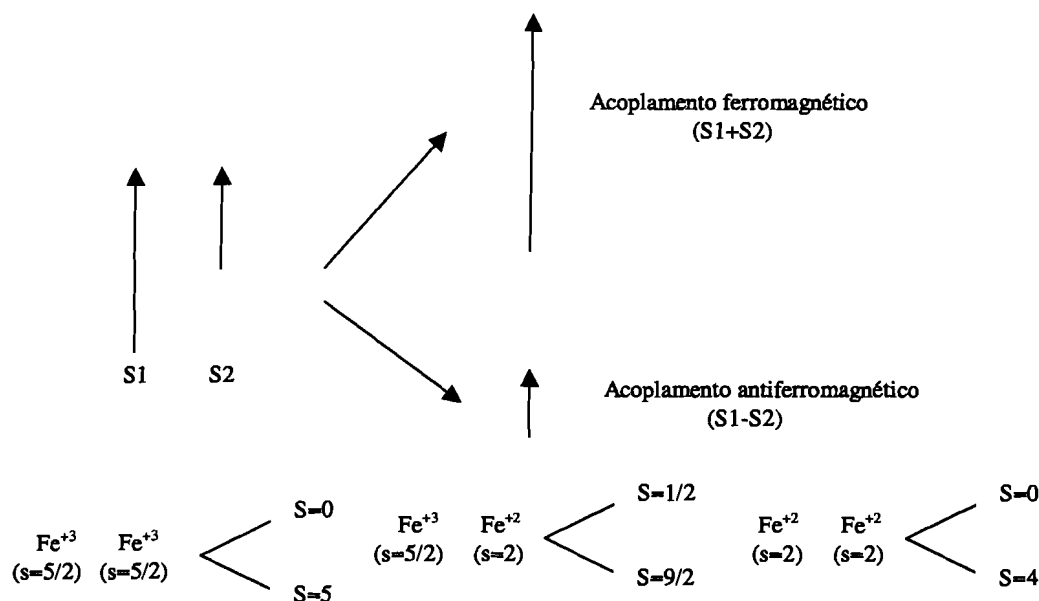
Alguns núcleos possuem momento angular de spin,  $I$ , com propriedades análogas às do spin electrónico, constituindo este facto, a base fundamental da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A este spin nuclear está também associado um momento magnético que, por criar um campo magnético local, interacciona com o spin electrónico, designando-se esta interacção por interacção nuclear hiperfina, a qual poderá ser isotrópica ou anisotrópica. O campo magnético efectivo sentido pelo electrão, como já foi anteriormente referido, é agora diferente do campo aplicado,  $B_0$ :  $B_{ef} = B_0 + B_{local}$ .

A presença desta interacção hiperfina constitui uma forma de identificação inequívoca do átomo, ou ião paramagnético que contribui para o espectro de RPE, sendo também extremamente útil para a identificação da esfera de coordenação de iões metálicos.

### **Sistemas polinucleares**

Como é sabido, numerosos sistemas biológicos possuem agregados metálicos polinucleares. Nestes casos o espectro de RPE corresponde ao centro como um todo, e não aos átomos individuais que o constituem. As propriedades magnéticas destes agregados dependem não só das propriedades magnéticas, isto é, do spin de cada átomo, mas também do modo como os spins dos vários átomos interaccionam. Esta interacção, ou acoplamento, induz alterações drásticas no espectro de RPE que se observa. Dentro deste caso, pode-se por exemplo referir o caso dos centros binucleares de ferro. O ferro, na maioria dos sistemas biológicos aparece nos estados de oxidação +2 e +3. No caso do agregado  $[2Fe-2S]$  ao ferro (II), sistema  $3d^6$ , está associado um spin  $S=2$ , enquanto que ao ferro (III), sistema  $3d^5$ , estará

associado um sistema  $S=5/2$ . Os momentos magnéticos de cada ião neste agregado podem interactivar basicamente de dois modos: os dois momentos magnéticos somam-se (acoplamento ferromagnético), ou subtraem-se (acoplamento antiferromagnético) apresentados na Figura A.3.



**Figura A.3.** Acoplamento ferromagnético e antiferromagnético em centros binucleares de ferro. Em baixo são indicados os valores possíveis de spin total ( $S$ ) do centro, consoante os estados de oxidação de cada átomo de ferro.

À medida que aumenta a nuclearidade do centro, a situação torna-se mais complexa. No entanto os espectros de RPE são essencialmente típicos do tipo de agregado metálico, em particular no caso dos centros  $[\text{Fe-S}]$ . As diferentes características dos sinais de RPE apresentadas por estes agregados mais complexos, permitem, novamente, determinar não só o tipo de centro mas também seguir as suas transformações, seja por reacções redox, seja por reacção com substratos ou mesmo a sua interconversão: por exemplo, a conversão  $[3\text{Fe-4S}]$

⇔ [4Fe-4S] leva à completa transformação do espectro de RPE, podendo seguir-se este processo *in vitro* ou mesmo em extractos celulares.

## Bibliografia

1. Parish, R. V. in *NMR, NQR, EPR and Mössbauer spectroscopy in Inorganic chemistry*. (J.Burguess, ed), pp. 168-182, Ellis Horward Limited, Great Britain
2. Knowles, P. F., Marsh, D., and Rattle, H. W. E. (1976) in *Magnetic Ressonance of Biomolecules*, pp. 168-191, John Wiley & Sons, Great Britain
3. Wertz, J. E., and Bolton, J. R. (1986) in *Electron Spin Ressonance*, pp. 17-20, 38-47, Chapman and Hall, USA
4. Gibson, J. F. (1979) in *ESR and NMR of Paramagnetic Species in Biological and Related Systems* (Bertini, I., and Drago, R. S., eds), D.Reidel Publishing Company, Holland
5. *Advanced EPR - Aplications in Biology ans Biochemistry* (Hoff, A.J., eds), Elsevier Science Publishers (1989)

## **Apêndice B**

### **O Programa para o Modelo de Acoplamento de Spins para o Estado Intermediário da Ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas***

## O Programa para o modelo de acoplamento de spins para o estado intermediário da ferredoxina II de *Desulfovibrio gigas*.

```

C  PROGRAM 3SP.F
C  THREE SPIN PROGRAM
  IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
  REAL*8 EV(216),BOPR(216),HH(2,216,216)
  COMPLEX*16 S1X(6,6),S1Y(6,6),S1Z(6,6)
C----- COMPLEX*16 SP(6,6),SM(6,6),SCOEF(6)
  COMPLEX*16 S1X2(6,6),S1Y2(6,6),S1Z2(6,6),HAM(216,216),C(216,216)
  COMPLEX*16 S2X(6,6),S2Y(6,6),S2Z(6,6),IS1(6,6),IS2(6,6)
  COMPLEX*16 S2X2(6,6),S2Y2(6,6),S2Z2(6,6)
  COMPLEX*16 S3X(6,6),S3Y(6,6),S3Z(6,6),IS3(6,6)
  COMPLEX*16 S3X2(6,6),S3Y2(6,6),S3Z2(6,6)
  REAL*8 SH1(216),SH2(216),SH3(216),UR(216,216),UI(216,216)
  REAL*8 J12,J13,J23
  character*30 outfct,gvout,spinout
C  REAL*8 HAP,TEMP
C-----COMPLEX*16 ZERO
  COMMON/PARM/ D1,D2,EVERD1,EVERD2,G1X,G1Y,G1Z,G2X,G2Y,G2Z,
1    J12,J13,J23,HAP,TEMP,G3X,G3Y,G3Z,D3,EVERD3
  COMMON/MAT/ S1X,S1Y,S1Z,S2X,S2Y,S2Z,S1X2,S1Y2,S1Z2,IS1,IS2,
2    S2X2,S2Y2,S2Z2,S3X,S3Y,S3Z,S3X2,S3Y2,S3Z2,IS3
  COMMON/VPS/G1(216,216,3)
  common/vps1/HAM
  COMMON/VPS2/HX,HY,HZ
  COMMON/VPE/TTP(1000),XTH1(1000),XTH2(1000),XTH3(1000)
  COMMON/VPL/TEMPI,TEMPF,DTEMP,NPOINTS,NTH,NFI
  COMMON/VEL/IVL
  common/svp/outfct,gvout,spinout
  common/ssp/sssth1(1000),sssth2(1000),sssth3(1000)
  COMMON/AVAL/AVAL1,AVAL2,AVAL3
  IDLT(I,J)=(I/J)*(J/I)
  ND=216
c    ppm=1000
  ppm=1000000
  BETAE=0.0466872
c    CVC=77.2
  cvc=0.23487
  DO 150 I=1,1000
    TTP(I)=0.0
    XTH1(I)=0.0
    XTH2(I)=0.0
150  XTH3(I)=0.0
    IVL=0
C+++++
C INPUT PARAMETERS
C+++++

  CALL INPAR(N1ST,N2ST,N3ST,IPRINT)
  oPEN(12,FILE='PRN')
  OPEN(14,FILE=outfct)
  OPEN(16,FILE=gvout)
  open(18,file=spinout)
c    write(14,*)NFI,nth

```

```

      cvc=cvc/hap
c    WRITE(*,*)'AFTER INPAR'
C+++++
C DISPLAY PARAMETERS
C+++++

      CALL SHOP(N1ST,N2ST,N3ST,IPRINT)
c    WRITE(*,*)'AFTR SHOP'
      NSTATES=N1ST*N2ST*N3ST
      NDUB=NSTATES/2
      S1=(N1ST-1.0)/2.0
      S2=(N2ST-1.0)/2.0
      S3=(N3ST-1.0)/2.0

C+++++
C    CSTRUCT SPLUS AND SMINUS IN THE /S,M> BASIS.
C+++++

      CALL SPOP(ND,N1ST,N2ST,N3ST)
c    WRITE(*,*)'AFTR SPOP'
C    CHOOSE DIRECTION FOR APPLIED FIELD AND CONSTRUCT HAMILTONIAN
      IHAP=0
      DO 1700 IFI=1,NFI
      FIM=0.5*3.141529*(1.*IFI-0.5)/(1.*NFI)
      DO 1700 ITH=1,NTH
      COT=(1.*ITH-0.5)/(1.*NTH)
      THM=ACOS(COT)
      HX=HAP*SIN(THM)*COS(FIM)
      HY=HAP*SIN(THM)*SIN(FIM)
      HZ=HAP*COS(THM)
C 35  DO 70 IHAP=1,3
35  IF(NTH.EQ.1.AND.NFI.EQ.1)IHAP=IHAP+1
      IF(NTH.EQ.1.AND.NFI.EQ.1)HX=HAP*IDLT(1,IHAP)
      IF(NTH.EQ.1.AND.NFI.EQ.1)HY=HAP*IDLT(2,IHAP)
      IF(NTH.EQ.1.AND.NFI.EQ.1)HZ=HAP*IDLT(3,IHAP)
      DO 45 IH=1,NSTATES
      I3=1+(IH-1)/(N1ST*N2ST)
      I2=1+(IH-1)/N1ST-(I3-1)*N2ST
      I1=IH-(I2-1)*N1ST-((IH-1)/(N1ST*N2ST))*N1ST*N2ST
      DO 46 JH=1,IH
      J3=1+(JH-1)/(N1ST*N2ST)
      J2=1+(JH-1)/N1ST-(J3-1)*N2ST
      J1=JH-(J2-1)*N1ST-((JH-1)/(N1ST*N2ST))*N1ST*N2ST
      HAM(IH,JH)=D1*(S1Z2(I1,J1)-(S1*(S1+1.0)/3.0)*IS1(I1,J1)
1    +EVERD1*(S1X2(I1,J1)-S1Y2(I1,J1))*IS2(I2,J2)*IS3(I3,J3)
      HAM(IH,JH)=HAM(IH,JH)+D2*(S2Z2(I2,J2)-(S2*(S2+1.0)/3.0)*IS2(I2,J2)
2    +EVERD2*(S2X2(I2,J2)-S2Y2(I2,J2))*IS1(I1,J1)*IS3(I3,J3)
      HAM(IH,JH)=HAM(IH,JH)+D3*(S3Z2(I3,J3)-(S3*(S3+1.0)/3.0)*IS3(I3,J3)
3    +EVERD3*(S3X2(I3,J3)-S3Y2(I3,J3))*IS1(I1,J1)*IS2(I2,J2)
      HAM(IH,JH)=HAM(IH,JH)+BETAE*
4    (HZ*(G1Z*S1Z(I1,J1)*IS2(I2,J2)+G2Z*S2Z(I2,J2)*IS1(I1,J1))+HY*
5    (G1Y*S1Y(I1,J1)*IS2(I2,J2)+G2Y*S2Y(I2,J2)*IS1(I1,J1))+HX*
6    (G1X*S1X(I1,J1)*IS2(I2,J2)+G2X*S2X(I2,J2)*IS1(I1,J1))*IS3(I3,J3)
      HAM(IH,JH)=HAM(IH,JH)+BETAE*(HZ*G3Z*S3Z(I3,J3)*IS2(I2,J2)
7    +HY*G3Y*S3Y(I3,J3)*IS2(I2,J2)+HX*G3X*S3X(I3,J3))*IS2(I2,J2)
8    *IS1(I1,J1)
      HAM(IH,JH)=HAM(IH,JH)+(J12*S1Z(I1,J1)*S2Z(I2,J2)
9    +J12*S1Y(I1,J1)*S2Y(I2,J2)+J12*S1X(I1,J1)*S2X(I2,J2))*IS3(I3,J3)
9    +(J13*S1Z(I1,J1)*S3Z(I3,J3)+J13*S1Y(I1,J1)*S3Y(I3,J3)
9    +J13*S1X(I1,J1)*S3X(I3,J3))*IS2(I2,J2)
      HAM(IH,JH)=HAM(IH,JH)+(J23*S3Z(I3,J3)*S2Z(I2,J2)

```



```

9+J23*S3Y(I3,J3)*S2Y(I2,J2)+J23*S3X(I3,J3)*S2X(I2,J2))*is1(i1,j1)
46 CONTINUE
45 CONTINUE
C+++++
c WRITE(*,*)'AFTER MATRIX ELEMENTS '
C DIAGONALIZE HAMILTONIAN
C+++++
c write(*,*)nstates
N=NSTATES
DO 555 I=1,NSTATES
DO 557 J=1,NSTATES
c write(*,*)i,j
HH(1,I,J)=REAL(HAM(I,J))
c write(*,*)HAM(I,J)
HH(2,I,J)=DIMAG(HAM(I,J))
c WRITE(*,*)HH(1,I,J),HH(2,I,J)
c read(*,*)
557 continue
555 CONTINUE
c write(*,*)'before hermat'
CALL HERMAT(216,NSTATES,HH,EV,UR,UI)
c WRITE(*,*)'AFTER HERMAT'
DO 556 I=1,NSTATES
DO 556 J=1,NSTATES
C(I,J)=UR(I,J)+(0.,1.)*UI(I,J)
556 CONTINUE
c WRITE(*,*)'AFTER DIAG'
C+++++
C CALCULATE EXPECTATION VALUES OF S1 AND S2.
C+++++
TEMP=TEMPI
c write(*,*)'before exp3'
CALL EXP3(NSTATES,N1ST,N2ST,N3ST,EV,C,ND,SH1,SH2,SH3,BOPR,STH1,
1STH2,STH3)
c WRITE(*,*)'AFTER EXP3'
C+++++
C WRITE OUT ENERGIES AND EXPECTATION VALUES.
C+++++
c WRITE(*,*)HX,HY,HZ
c write(*,*)'before out'
IF(NTH.EQ.1.AND.NFI.EQ.1)CALL OUT(EV,SH1,SH2,SH3,BOPR,STH1,
1STH2,STH3,NSTATES,IPRINT)
c WRITE(*,*)'AFTER OUT'
DO 1600 IT=1,NPOINTS+1
TE=TEMPI+DTEMP*(IT-1)
TTP(IT)=TE
c WRITE(*,*)'BEFORE BOPOP'
CALL BOPOP(ND,NSTATES,TE,EV,BOPR)
c write(*,*)'after bopop'
STH1=0.
STH2=0.
STH3=0.
DO 1800 I=1,NSTATES
STH1=STH1+SH1(I)*BOPR(I)
STH2=STH2+SH2(I)*BOPR(I)
STH3=STH3+SH3(I)*BOPR(I)
c write(14,*)sth1,sth2,sth3
1800 continue
c
IF(NTH.EQ.1.AND.NFI.EQ.1) then
XTH1(IT)=XTH1(IT)+ppm*CVC*AVAL1*STH1/3

```

```

      XTH2(IT)=XTH2(IT)+ppm*CVC*AVAL2*STH2/3
      XTH3(IT)=XTH3(IT)+ppm*CVC*AVAL3*STH3/3
    else
c    write(14,*)'-----'
      XTH1(IT)=XTH1(IT)+ppm*CVC*AVAL1*STH1/(NTH*NFI)
      XTH2(IT)=XTH2(IT)+ppm*CVC*AVAL2*STH2/(NTH*NFI)
      XTH3(IT)=XTH3(IT)+ppm*CVC*AVAL3*STH3/(NTH*NFI)
c    write(14,*)xth1(it),xth2(it),xth3(it)
c    write(14,*)'-----'
    endif
c
    ssth1(it)=sth1
    ssth2(it)=sth2
    ssth3(it)=sth3
1600 continue
C+++++
C IF KRAMERS SYSTEM CALCULATE G-VALUES.
C+++++

      IH=IHAP
      IF(NTH.EQ.1.AND.NFI.EQ.1)CALL GVAL(NDUB,EV,NSTATES,IH)
c    write(*,*)'after GVAL'
C 70 CONTINUE
      IF(NFI.EQ.1.AND.NTH.EQ.1.AND.IHAP.LT.3)GO TO 35
1700 CONTINUE
C+++++
C WRITE OUT G-VALUES
C+++++
C-----
C-----IF(NDUB*2.NE.NSTATES)GOTO 90
      IF(NTH.NE.1.AND.NFI.NE.1)GO TO 90
      IPRIN1=IPRINT+2
      WRITE(IPRIN1,208)
208  FORMAT(1X/,1X,'G-VALUES',8X,'X',9X,'Y',9X,'Z',/)
C  DO 80 I=2,NDUB
C 80  WRITE(IPRIN1,209)I,(G(I,IHAP),IHAP=1,3)
      DO 80 I=2,nstates
      DO 80 J=1,I-1
      if(G1(I,J,1).GE.15.OR.G1(I,J,2).GE.15.OR.G1(I,J,3).GE.15.)GO TO 79
      WRITE(IPRIN1,209)IJ,(G1(I,J,IHAP),IHAP=1,3)
79  CONTINUE
80  CONTINUE
C 209  FORMAT(5X,I2,4X,3F10.6,/)
209  FORMAT(2X,I3,2X,I3,3X,3F10.6,/)
90  CONTINUE
      WRITE(14,1704)
1704  FORMAT('*****')
      WRITE(14,1705)
1705  FORMAT(1X,'TEMPERATURE',1X,'NMR SHIFT Fe1',
11X,'NMR SHIFT Fe2',1X,'NMR SHIFT Fe3')
      WRITE(14,1704)
      DO 1720 I=1,NPOINTS+1
1720  WRITE(14,1710)TTP(I),XTH1(I),XTH2(I),XTH3(I)
      WRITE(14,1704)
1710  FORMAT(1X,F6.2,2X,F15.9,2X,F15.9,2X,F15.9)
      write(18,1704)
      DO 1730 I=1,NPOINTS+1
1730  WRITE(18,1710)TTP(I),ssTH1(I),ssTH2(I),ssTH3(I)
      WRITE(18,1704)
      CLOSE(14)
      CLOSE(12)

```

```

CLOSE(16)
close(18)
c  IF(IPRINT.EQ.14)WRITE(*,*)'SPIN VALUES ARE WRITTEN IN 3SPOUT'
c  IF(IPRINT.EQ.14)WRITE(*,*)'G-VALUES ARE WRITTEN IN 3GVOUT'
STOP
END
C+++++
SUBROUTINE INPAR(N1ST,N2ST,N3ST,IPRINT)
IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
C  REAL*8 D1,D2,EVERD1,EVERD2,HAP,TEMP,G1X,G1Y,G1Z,G2X,G2Y,G2Z
REAL*8 J12,J13,J23
C  REAL*8 G3X,G3Y,G3Z,D3,EVERD3
character*30 outfct,gvout,spinout
COMMON/PARM/ D1,D2,EVERD1,EVERD2,G1X,G1Y,G1Z,G2X,G2Y,G2Z,
1 J12,J13,J23,HAP,TEMP,G3X,G3Y,G3Z,D3,EVERD3
COMMON/VPL/TEMPI,TEMPF,DTEMP,NPOINTS,NTH,NFI
COMMON/AVAL/AVAL1,AVAL2,AVAL3
common/svp/outfct,gvout,spinout

write(*,154)
154 format(1x,////)
write(*,*)'*****'
WRITE(*,10)
10 FORMAT(1X,'      THREE SPIN COUPLING PROBLEM')
WRITE(*,20)
20 FORMAT(1X,'      S1 COUPLES TO S2 TO S3 ')
WRITE(*,30)
30 FORMAT(1X,'  NOTE: 1/2 .LE.S1.LE.S2.LE.S3.LE. 5/2',/)
write(*,*)'*****'
WRITE(*,152)
152 FORMAT(1X,'TYPE (14) for outputs to',$(
write(*,153)
153 format(1x,' spinout*+gvout*+fctout* ',$(
read(*,36)iprint
36 FORMAT(I2)
WRITE(*,40)
40 FORMAT(1X,' N1STATES=?',$(
READ(*,50)N1ST
50 FORMAT(I1)
WRITE(*,55)
55 FORMAT(1X,' N2STATES=?',$(
READ(*,*)N2ST
WRITE(*,56)
56 FORMAT(1X,' N3STATES=?',$(
READ(*,*)N3ST
WRITE(*,100)
100 FORMAT(1X,' HAPPL (KGAUSS) =',$(
READ(*,*)HAP
WRITE(*,120)
120 FORMAT(1X,'INITIAL TEMP (K) =',$(
READ(*,*)TEMPI
WRITE(*,121)
121 FORMAT(1X,'FINAL TEMP (K) =',$(
READ(*,*)TEMPF
WRITE(*,122)
122 FORMAT(1X,'NUMBER OF POINTS BETWEEN INT. AND FINAL TEMP(K)=',$(
READ(*,*)NPOINTS
DTEMP=(TEMPF-TEMPI)/NPOINTS
TEMP=TEMPI
WRITE(*,60)
60 FORMAT(1X,' D(SPIN#1) (1/CM)=',$(

```

```

      READ(*,*)D1
      WRITE(*,80)
80  FORMAT(1X,' E/D(SPIN#1) = ', $)
      READ(*,*)EVERD1
      WRITE(*,140)
140 FORMAT(1X,' G1X = ', $)
      READ(*,*)G1X
      WRITE(*,160)
160 FORMAT(1X,' G1Y = ', $)
      READ(*,*)G1Y
      WRITE(*,180)
180 FORMAT(1X,' G1Z = ', $)
      READ(*,*)G1Z
      WRITE(*,190)
190 FORMAT(1X,' D(SPIN#2) = ', $)
      READ(*,*)D2
      WRITE(*,195)
195 FORMAT(1X,' E/D(SPIN#2) (1/CM) = ', $)
      READ(*,*)EVERD2
      WRITE(*,200)
200 FORMAT(1X,' G2X = ', $)
      READ(*,*)G2X
      WRITE(*,220)
220 FORMAT(1X,' G2Y = ', $)
      READ(*,*)G2Y
      WRITE(*,240)
240 FORMAT(1X,' G2Z = ', $)
      READ(*,*)G2Z
      WRITE(*,191)
191 FORMAT(1X,' D(SPIN#3) = ', $)
      READ(*,*)D3
      WRITE(*,196)
196 FORMAT(1X,' E/D(SPIN#3) (1/CM) = ', $)
      READ(*,*)EVERD3
      WRITE(*,201)
201 FORMAT(1X,' G3X = ', $)
      READ(*,*)G3X
      WRITE(*,221)
221 FORMAT(1X,' G3Y = ', $)
      READ(*,*)G3Y
      WRITE(*,241)
241 FORMAT(1X,' G3Z = ', $)
      READ(*,*)G3Z
      WRITE(*,260)
260 FORMAT(1X,' J COUPLING CONSTANTS ', $)
      WRITE(*,270)
270 FORMAT(1X,' J12 = ', $)
      READ(*,*)J12
      WRITE(*,290)
290 FORMAT(1X,' J13 = ', $)
      READ(*,*)J13
      WRITE(*,310)
310 FORMAT(1X,' J23 = ', $)
      READ(*,*)J23
      WRITE(*,361)
361 FORMAT(1X,'Intrinsic A-value (MHz) AVAL1 = ', $)
      READ(*,*)AVAL1
      WRITE(*,362)
362 FORMAT(1X,'Intrinsic A-value (MHz) AVAL2 = ', $)
      READ(*,*)AVAL2
      WRITE(*,363)

```

```

363 FORMAT(1X,'Intrinsic A-value (MHz) AVAL3 =',$)
    READ(*,*)AVAL3
    WRITE(*,350)
350 FORMAT(1X,'NUMBER OF POINTS OF THE THETA ANGLE(0,90)=$)
    READ(*,*)NTH
    WRITE(*,351)
351 FORMAT(1X,'NUMBER OF POINTS OF THE PHI ANGLE(0,90)=$)
    READ(*,*)NFI
    write(*,400)
400 format(1x,'Give output file name for Fermi Contact term=',$)
    read(*,405)outfct
    write(*,410)
405 format(a30)
410 format(1x,'Give output file name for G-values(gvout)=$)
    read(*,405)gvout
    write(*,407)
407 format(1x,'Give output file name for Spin-values=',$)
    read(*,405)spinout
    RETURN
    END
C+++++
SUBROUTINE OUT(EV,SH1,SH2,SH3,BOPR,STH1,STH2,STH3,NST,
1IPRINT)
    IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
    REAL*8 SH1(NST),SH2(NST),BOPR(NST),EV(NST)
    REAL*8 J12,J13,J23,SH3(NST)
    character*30 outfct,gvout,spinout
    COMMON/PARM/ D1,D2,EVERD1,EVERD2,G1X,G1Y,G1Z,G2X,G2Y,G2Z,
1      J12,J13,J23,HAP,TEMP,G3X,G3Y,G3Z,D3,EVERD3
    COMMON/VPS2/HX,HY,HZ
    COMMON/VEL/IVL
    common/svp/outfct,gvout,spinout
    IVL=IVL+1
    iprintv=iprint+4
c    WRITE(*,*)'IN TH OUT'
c    WRITE(*,*)NST
C-----PUT PROPRINTER INTO CONDENSED MODE.
C-----IF(IPRINT.EQ.12)WRITE(IPRINT,'(2A1\')CHAR(27),CHAR(15)
C    WRITE(*,*)'1'
C    WRITE(*,*)IPRINT
    WRITE(iprintv,*)nst
C    WRITE(*,*)HX,HY,HZ
C    WRITE OUT ENERGIES AND EXPECTATION VALUES.
    WRITE(IPRINTv,204)HX,HY,HZ
    IF(IVL.EQ.1)WRITE(IPRINTv,203)
    IF(IVL.EQ.1)WRITE(IPRINTv,202)(I,I=1,NST)
203 FORMAT(1X,'STATE #')
202 FORMAT(10(2X,I3,2X))
204 FORMAT(1X,'HAP=(',F5.1,'X',F5.1,'Y',F5.1,'Z)')
    WRITE(IPRINTv,206)
    WRITE(IPRINTv,205)(EV(I),I=1,NST)
206 FORMAT(1X,'ENERGY=')
205 FORMAT(10(1X,F7.1))
    WRITE(IPRINTv,215)
    WRITE(IPRINTv,212)(SH1(I),I=1,NST)
    WRITE(IPRINTv,216)
    WRITE(IPRINTv,213)(SH2(I),I=1,NST)
    WRITE(IPRINTv,217)
    WRITE(IPRINTv,214)(SH3(I),I=1,NST)
212 FORMAT(10(1X,F5.2,1X))
213 FORMAT(10(1X,F5.2,1X))

```

```

214 FORMAT(10(1X,F5.2,1X))
215 FORMAT(1X,'S1 // HAP')
216 FORMAT(1X,'S2 // HAP')
217 FORMAT(1X,'S3 // HAP')
    WRITE(IPRINTv,218)
    WRITE(IPRINTv,210)(BOPR(I),I=1,NST)
210 FORMAT(10(1X,F5.3,1X))
218 FORMAT(1X,'POP.=')
    WRITE(IPRINTv,211) STH1,STH2,STH3
211 FORMAT(1X,'<S1> THERMAL',F8.5,5X,'<S2> THERMAL',F8.5,
    15x,'<S3> THERMAL',F8.5)
    WRITE(IPRINTv,207)
207 FORMAT(1X/)
c    WRITE(*,*)'END OF OUT'
C---CANCEL PROPRINTER CONDENSED MODE.
C---IF(IPRINT.EQ.12)WRITE(IPRINT,'(2A1\)' CHAR(27),CHAR(18)

    RETURN
    END
C+++++
    SUBROUTINE SHOP(N1ST,N2ST,N3ST,IPRINT)
    IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
C    REAL*8 D1,EVERD1,HAP,TEMP,G1X,G1Y,G1Z,G2X,G2Y,G2Z,J12,J13,J23
    REAL*8 J12,J13,J23
C    REAL*8 D2,EVERD2,G3X,G3Y,G3Z,D3,EVERD3
    COMMON/PARM/ D1,D2,EVERD1,EVERD2,G1X,G1Y,G1Z,G2X,G2Y,G2Z,
1    J12,J13,J23,HAP,TEMP,G3X,G3Y,G3Z,D3,EVERD3
    COMMON/VPL/TEMPI,TEMPF,DTEMP,NPOINTS,NTH,NFI
    COMMON/AVAL/AVAL1,AVAL2,AVAL3
    NSTATES=N1ST*N2ST*N3ST
    S1=(N1ST-1.0)/2.0
    S2=(N2ST-1.0)/2.0
    S3=(N3ST-1.0)/2.0
C    WRITE(*,*)'SHOP 1'
    WRITE(IPRINT,10)S1,S2,S3
10  FORMAT(1X,' S1 =',F4.1,3X,' AND S2 =',F4.1,3X,' AND S3=',F4.1)
    WRITE(IPRINT,15)
15  FORMAT(5X,'COUPLE TO FORM SYSTEM SPIN S')
    WRITE(IPRINT,20)J12,J13,J23,HAP,TEMP
20  FORMAT(1X,' J12 =',F6.1,1X,' J13 =',F6.1,1X,' J23 =',F6.1,1X,
1  ' HAP =',F6.2,1X,'T(K) =',F6.2)
C    WRITE(*,*)'SHOP 1'
    WRITE(IPRINT,25)D1,D2,D3
    WRITE(IPRINT,26)EVERD1,EVERD2,EVERD3
25  FORMAT(1X,'D(S#1) =',F5.1,1X,'D(S#2) =',F5.1,1X,'D(S#3) =',F5.1)
26  FORMAT(1X,'E/D(S#1) =',F5.2,1X,'E/D(S#2) =',F5.2,1X,
1  'E/D(S#3) =',F5.2)
    WRITE(IPRINT,30)G1X,G1Y,G1Z
30  FORMAT(1X,' G1X =',F8.4,' G1Y =',F8.4,' G1Z =',F8.4)
    WRITE(IPRINT,40)G2X,G2Y,G2Z
40  FORMAT(1X,' G2X =',F8.4,' G2Y =',F8.4,' G2Z =',F8.4)
    WRITE(IPRINT,41)G3X,G3Y,G3Z
41  FORMAT(1X,' G3X =',F8.4,' G3Y =',F8.4,' G3Z =',F8.4)
    WRITE(IPRINT,501)AVAL1
501  FORMAT(1X,'INTRINSIC A-VALUE1 (MHz) =',F8.4)
    WRITE(IPRINT,502)AVAL2
502  FORMAT(1X,'INTRINSIC A-VALUE2 (MHz) =',F8.4)
    WRITE(IPRINT,503)AVAL3
503  FORMAT(1X,'INTRINSIC A-VALUE3 (MHz) =',F8.4)
    WRITE(IPRINT,36)TEMPI,TEMPF,NPOINTS
36  FORMAT(1X,'TEMPI(K) =',F6.2,1X,'TEMPF(K) =',F6.2,1X,'NPOINTS =',I4)

```

```

WRITE(IPRINT,37)NTH,NFI
37 FORMAT(1X,' NTHETA=',I6,1X,'NPHI =',I6)

RETURN
END
C+++++
SUBROUTINE SPOP(ND,N1ST,N2ST,N3ST)
IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
REAL*8 SCOE(6)
REAL*8 J12,J13,J23
COMPLEX*16 S1X(6,6),S1Y(6,6),S1Z(6,6),SP(6,6),SM(6,6)
COMPLEX*16 S1X2(6,6),S1Y2(6,6),S1Z2(6,6)
COMPLEX*16 S2X(6,6),S2Y(6,6),S2Z(6,6),IS1(6,6),IS2(6,6)
COMPLEX*16 S2X2(6,6),S2Y2(6,6),S2Z2(6,6)
COMPLEX*16 S3X(6,6),S3Y(6,6),S3Z(6,6),IS3(6,6)
COMPLEX*16 S3X2(6,6),S3Y2(6,6),S3Z2(6,6)
COMPLEX*16 ZERO
COMMON/PARM/ D1,D2,EVERD1,EVERD2,G1X,G1Y,G1Z,G2X,G2Y,G2Z,
1 J12,J13,J23,HAP,TEMP,G3X,G3Y,G3Z,D3,EVERD3
COMMON/MAT/ S1X,S1Y,S1Z,S2X,S2Y,S2Z,S1X2,S1Y2,S1Z2,IS1,IS2,
1 S2X2,S2Y2,S2Z2,S3X,S3Y,S3Z,S3X2,S3Y2,S3Z2,IS3

IDLT(I,J)=(I/J)*(J/I)
C INITIALIZE MATRICES SP,SM TO ZERO
ZERO=(0.,0.)
DO 10 I=1,6
DO 10 J=1,6
SP(I,J)=ZERO
SM(I,J)=ZERO
10 CONTINUE
S1=(N1ST-1.0)/2.0
S2=(N2ST-1.0)/2.0
S3=(N3ST-1.0)/2.0
C CONSTRUCT S1X,S1Y,S1Z IN THE /SM> BASIS
CALL SPLUS(ND,N1ST,SCOE)
DO 20 J1=2,N1ST
I1=J1-1
SP(I1,J1)=dcmplx(SCOE(I1))
20 SM(J1,I1)=DCONJG(SP(I1,J1))

DO 35 I1=1,N1ST
DO 35 J1=1,N1ST
C IS1 IS IDENTITY MATRIX FOR S1
IS1(I1,J1)=IDLT(I1,J1)
S1X(I1,J1)=0.5*(SP(I1,J1)+SM(I1,J1))
S1Y(I1,J1)=(0.,-0.5)*(SP(I1,J1)-SM(I1,J1))
35 S1Z(I1,J1)=(S1-I1+1.0)*IDLT(I1,J1)

C CONSTRUCT S2X,S2Y,S2Z IN /S,M> BASIS.
CALL SPLUS(ND,N2ST,SCOE)
DO 21 J2=2,N2ST
I2=J2-1
SP(I2,J2)=DCMPLX(SCOE(I2))
21 SM(J2,I2)=DCONJG(SP(I2,J2))

DO 36 I2=1,N2ST
DO 36 J2=1,N2ST
C IS2 IS IDENTITY MATRIX FOR S2
IS2(I2,J2)=IDLT(I2,J2)
S2X(I2,J2)=0.5*(SP(I2,J2)+SM(I2,J2))
S2Y(I2,J2)=(0.,-0.5)*(SP(I2,J2)-SM(I2,J2))

```

```

36  S2Z(I2,J2)=(S2-I2+1.0)*IDLT(I2,J2)

C   CONSTRUCT S3X,S3Y,S3Z IN /S,M> BASIS.
    CALL SPLUS(ND,N3ST,SCOEF)
    DO 22 J3=2,N3ST
      I3=J3-1
      SP(I3,J3)=DCMPLX(SCOEF(I3))
22  SM(J3,I3)=DCONJG(SP(I3,J3))

    DO 37 I3=1,N3ST
      DO 37 J3=1,N3ST
C   IS2 IS IDENTITY MATRIX FOR S3
      IS3(I3,J3)=IDLT(I3,J3)
      S3X(I3,J3)=0.5*(SP(I3,J3)+SM(I3,J3))
      S3Y(I3,J3)=(0.,-0.5)*(SP(I3,J3)-SM(I3,J3))
37  S3Z(I3,J3)=(S3-I3+1.0)*IDLT(I3,J3)
C
C   CONSTRUCT MATRICES FOR SQUARES OF S1X,S1Y AND S1Z.
    CALL PROCM(S1X,N1ST,0,S1X,0,N1ST,S1X2,6)
    CALL PROCM(S1Y,N1ST,0,S1Y,0,N1ST,S1Y2,6)
    CALL PROCM(S1Z,N1ST,0,S1Z,0,N1ST,S1Z2,6)

C   CONSTRUCT MATRICES FOR SQUARES OF S2X,S2Y,S2Z.
    CALL PROCM(S2X,N2ST,0,S2X,0,N2ST,S2X2,6)
    CALL PROCM(S2Y,N2ST,0,S2Y,0,N2ST,S2Y2,6)
    CALL PROCM(S2Z,N2ST,0,S2Z,0,N2ST,S2Z2,6)

C   CONSTRUCT MATRICES FOR SQUARES OF S3X,S3Y,S3Z.
    CALL PROCM(S3X,N3ST,0,S3X,0,N3ST,S3X2,6)
    CALL PROCM(S3Y,N3ST,0,S3Y,0,N3ST,S3Y2,6)
    CALL PROCM(S3Z,N3ST,0,S3Z,0,N3ST,S3Z2,6)

    RETURN
    END
C+++++
SUBROUTINE SPLUS(ND,N,SCOEF)
C***
C***  THE SUBROUTINE SPLUS CALCULATES THE MATRIX ELEMENTS
C***  OF THE OPERATOR S PLUS WITHIN A SPIN MULTIPLY OF MULTIPLICITY
      IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
C***  N=2*S+1
C***  THE NON ZERO MATRIX ELEMENTS ARE
C***  (M+1/S PLUS/M)=SQRT(S*(S+1)-M*(M+1))
C***  THE ELEMENTS ARE STORED IN THE ARRAY SCOEF
      DIMENSION SCOEF(ND)
C***  N IS THE MULTIPLICITY OF THE SPIN, N=2*S+1
C***  SCOEF(1)=(S/SPLUS/S-1), SCOEF(2)=(S-1/SPLUS/S-2) , .....
C***
C***
      SCOEF(N)=0.
      N1=N-1
      S=N1
      S=S/2.0
      SQ=S*(S+1)
      SM=S-1.0
      DO 10 I=1,N1
        SCOEF(I)=DSQRT(SQ-SM*(SM+1))
        SM=SM-1.0
10  CONTINUE
      RETURN
      END

```



```

C+++++
SUBROUTINE PROCM(A,IA,JA,B,JB,C,ND)
C  PROCM CALCULATES THE PRODUCT OF SQUARE
C  MATRICES . C = A*B
C  SET IA=0 TO SUM OVER FIRST INDEX OF A,ETC.
  IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
  COMPLEX*16 A(ND,ND),B(ND,ND),C(ND,ND),AA,BB
C  SET OTHER INDEX TO LIMIT OF SUM (NEG. FOR CONJUGATE).
C  ADJOINT(A(I,J))=CONJG(A(J,I))
  M=IABS(IA+JA)
  IF(M.GT.ND) write(*,20)
20  FORMAT(1X,'M.GT.ND IN SUBROUTINE PROCM')
  IF((IA.EQ.0.AND.JA.EQ.0).OR.(IA.NE.0.AND.JA.NE.0))
  1  write(*,30)
30  FORMAT(1X,'IMPROPER IA OR JA IN PROCM')
  IF((IB.EQ.0.AND.JB.EQ.0).OR.(IB.NE.0.AND.JB.NE.0))
  1  write(*,35)
35  FORMAT(1X,'IMPROPER IB OR JB IN PROCM')
  DO 40 I=1,M
  DO 40 J=1,M
  C(I,J)=(0.,0.)
  DO 40 K=1,M
  AA=A(I,K)
  IF(IA.EQ.0) AA=A(K,I)
  IF(IA.LT.0.OR.JA.LT.0) AA=DCONJG(AA)
  BB=B(J,K)
  IF(IB.EQ.0) BB=B(K,J)
  IF(IB.LT.0.OR.JB.LT.0) BB=DCONJG(BB)
40  C(I,J)=C(I,J)+AA*BB
  RETURN
  END
C+++++
SUBROUTINE EXP3(NSTATES,N1ST,N2ST,N3ST,EV,C,ND,SH1,SH2,SH3,
1BOPR,STH1,STH2,STH3)
  IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
  REAL*8 EV(nstates),BOPR(nstates)
  COMPLEX*16 S1X(6,6),S1Y(6,6),S1Z(6,6)
  COMPLEX*16 S1X2(6,6),S1Y2(6,6),S1Z2(6,6)
  COMPLEX*16 S2X2(6,6),S2Y2(6,6),S2Z2(6,6)
  COMPLEX*16 C(216,216)
  COMPLEX*16 S2X(6,6),S2Y(6,6),S2Z(6,6),IS1(6,6),IS2(6,6)
  COMPLEX*16 S3X(6,6),S3Y(6,6),S3Z(6,6)
  COMPLEX*16 S3X2(6,6),S3Y2(6,6),S3Z2(6,6),IS3(6,6)
  REAL*8 ES1X(216),ES1Y(216),ES1Z(216)
  REAL*8 ES2X(216),ES2Y(216),ES2Z(216)
  REAL*8 ES3X(216),ES3Y(216),ES3Z(216)
  REAL*8 SH1(nstates),SH2(nstates),SH3(nstates),J12,J13,J23
  COMMON/PAARM/ D1,D2,EVERD1,EVERD2,G1X,G1Y,G1Z,G2X,G2Y,G2Z,
  1  J12,J13,J23,HAP,TEMP,G3X,G3Y,G3Z,D3,EVERD3
  COMMON/MAT/ S1X,S1Y,S1Z,S2X,S2Y,S2Z,S1X2,S1Y2,S1Z2,IS1,IS2,
  1  S2X2,S2Y2,S2Z2,S3X,S3Y,S3Z,S3X2,S3Y2,S3Z2,IS3
  COMMON/VPS2/HX,HY,HZ
C  CALCULATE EXPECTATION VALUES OF S1 AND S2,S3.????????????????
c  write(*,*)'before EXS'
  CALL EXS(ND,6,6,6,C,NSTATES,S1X,N1ST,IS2,N2ST,IS3,N3ST,ES1X)
  CALL EXS(ND,6,6,6,C,NSTATES,IS1,N1ST,S2X,N2ST,IS3,N3ST,ES2X)
  CALL EXS(ND,6,6,6,C,NSTATES,S1Y,N1ST,IS2,N2ST,IS3,N3ST,ES1Y)
  CALL EXS(ND,6,6,6,C,NSTATES,IS1,N1ST,S2Y,N2ST,IS3,N3ST,ES2Y)
  CALL EXS(ND,6,6,6,C,NSTATES,S1Z,N1ST,IS2,N2ST,IS3,N3ST,ES1Z)
  CALL EXS(ND,6,6,6,C,NSTATES,IS1,N1ST,S2Z,N2ST,IS3,N3ST,ES2Z)

```

```

CALL EXS(ND,6,6,6,C,NSTATES,IS1,N1ST,IS2,N2ST,S3X,N3ST,ES3X)
CALL EXS(ND,6,6,6,C,NSTATES,IS1,N1ST,IS2,N2ST,S3Y,N3ST,ES3Y)
CALL EXS(ND,6,6,6,C,NSTATES,IS1,N1ST,IS2,N2ST,S3Z,N3ST,ES3Z)
c  write(*,*)'after EXS'
C    CALCULATE THERMAL EXPECTATION VALUES ALONG H APPLIED.
DO 48 I=NSTATES,1,-1
48  EV(I)=EV(I)-EV(1)
    TE=TEMP
    CALL BOPOP(ND,NSTATES,TE,EV,BOPR)
c    write(*,*)'after bopop'
    STH1=0.
    STH2=0.
    STH3=0.
    DO 50 I=1,NSTATES
    SH1(I)=(ES1X(I)*HX+ES1Y(I)*HY+ES1Z(I)*HZ)/HAP
    SH2(I)=(ES2X(I)*HX+ES2Y(I)*HY+ES2Z(I)*HZ)/HAP
    SH3(I)=(ES3X(I)*HX+ES3Y(I)*HY+ES3Z(I)*HZ)/HAP
    STH1=STH1+SH1(I)*BOPR(I)
    STH2=STH2+SH2(I)*BOPR(I)
50  STH3=STH3+SH3(I)*BOPR(I)

    RETURN
    END
C+++++
SUBROUTINE BOPOP(ND,N,T,E,BOPR)
IMPLICIT REAL *8 (A-H,O-Z)
C***
C***  PURPOSE
C***  CALCULATION OF BOLTZMANN PROBABILITIES FOR N STATES WITH ENRGY E
C***
C***  INPUT PARAMETERS
C***  N = # OF STATES
C***  T = TEMPERATURE IN K
    DIMENSION E(N)
C***  = ENERGY IN WAVE NUMBERS
C***
C***  OUTPUT PARAMETERS
    DIMENSION BOPR(N)
C***  = BOLTZMANN PROBABILITIES
C***
C***
    HKT=0.695028*T
    E0=10000000.
    DO 10 I=1,N
10  IF (E0.GT.E(I)) E0=E(I)
    HSUM=0.
    DO 20 I=1,N
    H1=(E(I)-E0)/HKT
    IF (H1.GT.10.) GOTO 21
    H2=DEXP(-H1)
    BOPR(I)=H2
    HSUM=HSUM+H2
    GOTO 20
21  BOPR(I)=0.
20  CONTINUE
    DO 30 I=1,N
30  BOPR(I)=BOPR(I)/HSUM
    RETURN
    END
C+++++
SUBROUTINE EXS(ND,ND1,ND2,ND3,C,NST,O1,NST1,O2,NST2,

```

```

1O3,NST3,EO12)
C---ND,ND1 AND ND2,ND3 ARE ARRAY SIZES SPECIFIED IN MAIN.

C---EXS CALCULATES THE
C---VALUES OF THE THREE SPIN OPERATOR O WHERE O = O1 O2 O3.
C---I.E. <PSI(I)/ O /PSI(I)> = <PSI(I)/ O1 O2 O3 /PSI(I)>.
C---THE TWO SPIN BASIS STATES, /PHI(I)> = / M1, M2>,
C---MUST BE ORDERED SUCH THAT I = 1 + S1-M1 + NST1*(S2-M2).
C---I.E.I.E.NST, WHERE NST IS THE TOTAL NUMBER OF STATES.
C---NST = NST1 * NST2*NST3
C---NST1 = 2*S1 + 1
C---NST2 = 2*S2 + 1
C---NST3 =2*S3+1
C---C(J,I) = <PHI(J)/PSI(I)>, WHERE /PSI(I)> IS THE ITH
C---EIGENSTATE AND /PHI(J)> IS THE JTH BASIS STATE.

      IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
      COMPLEX*16 C(ND,ND),O1(ND1,ND1),O2(ND2,ND2),O3(ND3,ND3),E
      REAL*8 EO12(NST),EI

C      DO 37 II=1,NST
C 37  WRITE(14,38)(C(JJ,II),JJ=1,NST)
C 38  FORMAT(1X,6(F8.4,1X,F8.4))
c      write(*,*)'loop '
      DO 10 I=1,NST
      E = (0.,0.)
        DO 5 J3=1,NST3
        DO 5 J2=1,NST2
        DO 5 J1=1,NST1
        J = J1+(J2-1)*NST1+(J3-1)*NST2*NST1
        DO 5 K3=1,NST3
        DO 5 K2 =1,NST2
        DO 5 K1=1,NST1
        K = K1+(K2-1)*NST1+(K3-1)*NST2*NST1
c      write(*,20)j1,j2,j3,j,k1,k2,k3,k
c 20  format(8(i5))
      5  E = E + DCONJG(C(K,I))*O1(K1,J1)*O2(K2,J2)*O3(K3,J3)*C(J,I)

      EI = DIMAG(E)
      IF(DABS(EI).GT.0.0001) GO TO 99
10  EO12(I) = REAL(E)

      RETURN

99  CONTINUE
      WRITE(*,84)
84  FORMAT(1X,'EXPECTATION VALUE NOT REAL')
      WRITE(*,86)I
86  FORMAT(1X,I3)

      END
C+++++
SUBROUTINE GVAL(NDUB,EV,NSTATES,IHAP)
IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
REAL*8 EV(NSTATES),J12,J13,J23
COMMON/PARM/ D1,D2,EVERD1,EVERD2,G1X,G1Y,G1Z,G2X,G2Y,G2Z,
1  J12,J13,J23,HAP,TEMP,G3X,G3Y,G3Z,D3,EVERD3
COMMON/VPS/G1(216,216,3)
C+++++
C CALCULATE G-VALUES.
C+++++

```

```

      BETA=0.0466872
C    IF(NDUB*2.NE.NSTATES)GO TO 70
C    DO 60 I=1,NDUB
C    IA=2*I
C    IB=IA-1
      DO 60 I=2,nstates
      DO 60 J=1,I-1
C60   G(I,IHAP)=(EV(IA)-EV(IB))/(BETA*HAP)
      60   G1(I,J,IHAP)=(EV(J)-EV(I))/(BETA*HAP)
      70   RETURN
      END
C+++++
C    COMPILER DOUBLE PRECISION
      SUBROUTINE HERMAT(ND,N,HMATR,EIGENV,UR,UI)
C---ND IS THE DIMENSION SPECIFIED IN THE CALLING PROGRAM.
      IMPLICIT DOUBLE PRECISION(A-H,O-Z)
      REAL*8 HMATR(2,ND,ND),UR(ND,ND),UI(ND,ND),EIGENV(ND),
      1 B(1500),C(1500),TAU(2,1500),E(1500)
c    WRITE(*,*)ND,N
C    DO 10 I=1,N
C    WRITE(12,200)(HMATR(1,I,J),J=1,N)
C    WRITE(12,200)(HMATR(2,I,J),J=1,N)
C    WRITE(12,200)
C 10   CONTINUE
C 200  FORMAT(1X,12F10.4)
C**** REDUCE THE MATRIX TO A REAL TRIDIAGONAL FORM
c    WRITE(*,*)'BEFORE CODIAG'
      CALL CODIAG(ND,N,HMATR,TOLER,B,C,TAU)
c    WRITE(*,*)'AFTER CODIAG'
C    WRITE(*,201)
C 201  FORMAT(1H0,'AFTER CODIAG: B(I)= ; C(I)=')
C    WRITE(12,200) (B(I),I=1,N),(C(I),I=1,N)
C
C**** FIND EIGENSYSTEM OF TRIDIAGONAL FORM
C    SAVE SUBDIAGONAL
      DO 5 I=1,N
      5   E(I) = B(I)
c    WRITE(*,*)'BEFORE CHAR3'
      CALL CHAR3(ND,N,C,E,UR,EIGENV)
c    write(*,*)'after char3'
C    DO 15 I=1,N
C 15   WRITE(12,200)EIGENV(I),(UR(J,I),J=1,N)

C***TRANSFORM THE EIGENVECTORS OF THE REAL MATRIX TO THOSE OF
C***THE STARTING MATRIX
c    WRITE(*,*)'BEFORE CHANGE'
      CALL CHANGE(ND,N,B,HMATR,TAU,TOLER,UR,UI)
c    WRITE(*,*)'AFTER CHANGE'
C    WRITE(12,200)
C    WRITE(12,200)(EIGENV(I),I=1,N)
C    WRITE(12,200)
C    WRITE(12,200)
C    DO 20 I=1,N
C    WRITE(12,200)(UR(I,J),J=1,N)
C    WRITE(12,200)(UI(I,J),J=1,N)
C20   WRITE(12,200)
      RETURN
      END
C+++++
C    COMPILER DOUBLE PRECISION
C

```

```

SUBROUTINE CHAR3(ND,N,D,E,Z,VALU)
C
    IMPLICIT REAL*8(A-H,O-Z)
    DIMENSION D(1500), E(1500), Z(ND,ND), VALU(ND)
    REAL*8 MACHEP
C
C*****
C
C    THIS SOBROUTINE FINDS THE EIGENVALUES AND EIGENVECTORS
C    OF A SYMMETRIC TRIDIAGONAL MATRIX BY THE QL METHOD.
C
C    INPUT:
C    N IS THE ORDER OF THE MATRIX;
C    D CONTAINS THE DIAGONAL ELEMENTS OF THE INPUT MATRIX
C    E CONTAINS THE SUBDIAGONAL ELEMNTS OF THE INPUT MATRIX
C    IN ITS LAST N-1 POSITIONS. E(1) IS ARBITRARY;
C    Z CONTAINS THE TRANSFORMATION MATRIX PRODUCED IN THE
C    REDUCTION BY TRED2 (OR BY CODIAG), IF PERFORMED.
C    IF THE EIVENVECTORS OF THE TRIDIAGONAL MATRIX
C    ARE DESIRED, Z MUST CONTAIN THE IDENTITY MATRIX.
C
C    OUTPUT:
C    D CONTAINS THE EIGENVALUES IN ASCENDING ORDER. IF AN
C    ERROR EXIT IS MADE, THE EIGENVALUES ARE CORRECT BUT
C    UNORDERED FOR INDICIES 1,2,..., IERR-1;
C    VALU IS SET EQUAL TO D AND RETURNED TO HERMAT.
C    THIS VECTOR IS ADDED TO FOLLOW DIMENSIONING
C    CONVENTIONS USED IN EIGEN AND IS NOT NEEDED FOR THE
C    QL METHOD OF DIAGONALIZATION.
C    E HAS BEEN DESTROYED;
C    Z CONTAINS ORTHONORMAL EIGENVECTORS OF THE SYMMETRIC
C    TRIDIAGONAL (FULL) MATRIX. IF AN ERROR EXIT IS MADE,
C    Z CONTAINS THE EIGENVECTORS ASSOCIATED WITH THE STORED
C    EIGENVALUES;
C    IERR IS SET TO ZERO FOR NORMAL RETURN, OR J IF THE J-TH
C    EIGENVALUE HAS NOT BEEN DETERMINED AFTER 30 ITERATIONS.
C
C***  MACHEP IS A MACHINE DEPENDENT PARAMETER SPECIFYING
C    THE RELATIVE PRECISION OF FLOATING POINT ARITHMETIC ***
    MACHEP = 5.0E-8
C***  CHAR AND EIGEN STORE SUBDIAGONAL DIFFERENTLY
C    NM1 = N-1
C    DO 500 I=1,NM1
C        J = N-I
C500    E(J+1) = E(J)
C    E(1) = 0.0
C***
C***
C    WRITE (12,5) N
C5    FORMAT(1H0,'N = ',I5)
C    WRITE (12,6)
C6    FORMAT(1H0,5X,'DIAGONAL ELEMENTS',7X,'SUBDIAGONAL ELEMENTS')
C    DO 31 I=1,N
C31    WRITE (12,7) D(I), E(I)
C7    FORMAT(1H0,E18.10,E18.10)
C***
C    SET Z = THE IDENTITY MATRIX
    DO 11 I=1,N
    DO 11 J=1,N
11    Z(J,I) = 0.0
    DO 21 I=1,N

```

```

21  Z(I,I) = 1.0
C
      IERR = 0
      IF (N.EQ.1) GO TO 1001
C    DO 100 I=2,N
C100  E(I-1) = E(I)
      F = 0.0
      B = 0.0
C    E(N) = 0.0
      DO 240 L=1,N
      J = 0
      H = MACHEP * (DABS(D(L)) + DABS(E(L)))
      IF (B.LT.H) B=H
      IF (E(N).NE.0.0) WRITE(*,56) E(N)
56   FORMAT(1H0,'E(N) = ',E18.10,' INSTEAD OF 0.0,',
1     ' THEREFORE THE EIGEN SYSTEM FOUND BY CHAR IS IN ERROR')
C***  LOOK FOR SMALL SUBDIAGONAL ELEMENT ***
      DO 110 M=L,N
      IF (DABS(E(M)).LE.B) GO TO 120
C***  E(N) SHOULD ALWAYS BE ZERO AS SENT FROM CODIAG,
C    SO THERE IS NO EXIT
C    THROUGH THE BOTTOM OF THE LOOP ***
110  CONTINUE
120  IF (M.EQ.L) GO TO 220
130  IF (J.EQ.30) GO TO 1000
      J = J+1
C    *** FORM SHIFT ***
      P = (D(L+1) - D(L)) / (2.0 * E(L))
      R = DSQRT(P*P + 1.0)
      H = D(L) - E(L) / (P + DSIGN(R,P))
      DO 140 I=L,N
140  D(I) = D(I) - H
      F = F + H
C
C***  QL TRANSFORMATION ***
C
      P = D(M)
      C = 1.0
      S = 0.0
      MML = M-L
C***  FOR I = M-1 STEP -1 UNTIL DO -- ***
      DO 200 II=1,MML
      I = M - II
      G = C * E(I)
      H = C * P
      IF (DABS(P).LT.DABS(E(I))) GO TO 150
      C = E(I) / P
      R = DSQRT(C*C + 1.0)
      E(I+1) = S * P * R
      S = C/R
      C = 1.0 / R
      GO TO 160
150  C = P / E(I)
      R = DSQRT(C*C + 1.0)
      E(I+1) = S * E(I) * R
      S = 1.0 / R
      C = C * S
160  P = C * D(I) - S * G
      D(I+1) = H + S * (C*G + S*D(I))
C***  FORM VECTOR ***
      DO 180 K=1,N

```

```

      H = Z(K,I+1)
      Z(K,I+1) = S * Z(K,I) + C*H
      Z(K,I) = C*Z(K,I) - S*H
180  CONTINUE
200  CONTINUE
      E(L) = S * P
      D(L) = C * P
      IF (DABS(E(L)).GT.B) GO TO 130
220  D(L) = D(L) + F
240  CONTINUE
C
C***  ORDER EIGENVALUES AND EIGENVECTORS IN ASCENDING ORDER ***
C
      DO 300 II=2,N
      I = II - 1
      K = I
      P = D(I)
      DO 260 J=II,N
      IF (D(J).LE.P) GO TO 260
      K = J
      P = D(J)
260  CONTINUE
      IF (K.EQ.I) GO TO 300
      D(K) = D(I)
      D(I) = P
      DO 280 J=1,N
      P = Z(J,I)
      Z(J,I) = Z(J,K)
      Z(J,K) = P
280  CONTINUE
300  CONTINUE
      GO TO 1001
C
C***  SET ERROR - NO CONVERGENCE TO AN EIGENVALUE
C  AFTER 30 ITERRATIONS ***
1000 IERR = L
C
1001 CONTINUE
C***  EQUIVALENCE VALU AND D ***
      DO 61 K=1,N
      VALU(K) = D(K)
61  CONTINUE
C
C***
C  WRITE (12,8)
C8  FORMAT(1H0,'EIGENSYSTEM AFTER JCHAR')
C  DO 41 K=1,N
C  WRITE(12,2) K, D(K)
C  WRITE(12,2) K, VALU(K)
C  WRITE (12,3)
C  DO 51 I=1,N
C  WRITE (12,4) K,I,Z(I,K)
C51  CONTINUE
C41  CONTINUE
C2  FORMAT(1H0,'EIGENVALUE NO. ',I1,' IS', E18.10)
C3  FORMAT(1H0,'EIGENVECTOR COMPONENT --REAL AT THIS STAGE')
C4  FORMAT(1X,6X,I1,10X,I1,5X,E18.10)
C***
      RETURN
      END
C+++++

```

```

C   COMPILER DOUBLE PRECISION
C
C   SUBROUTINE CODIAG(ND,N,A,TOLER,B,C,TAU)
C   AS INPUT A IS THE HERMITIAN MATRIX OF ORDER N THAT IS TO BE
C   REDUCED TO TRIDIAGONAL SYMMETRIC FORM. AS OUTPUT, TOLER IS THE
C   DABSOLUTE MAXIMUM VALUE OF A. THE REAL VECTOR B CONTAINS THE
C   SUBDIAGONAL ELEMENTS OF THIS MATRIX. INFORMATION ON THE
C   HOUSEHOLDER REDUCTION CONTAINS THE DIAGONAL OF THE
C   UNITARY MATRIX T.
C
C   IMPLICIT REAL*8(A-H,O-Z)
C   DIMENSION A(2,ND,ND),B(1500),C(1500),TAU(2,1500)
C   NM1=N-1
C   GAMMA=1.0E-22
C   TOLER=0.0
C   DO 21 I=1,N
C   DO 21 J=1,I
C   DO 21 L=1,2
C   IF (DABS(A(L,I,J))-TOLER) 21,21,22
22  TOLER=DABS(A(L,I,J))
21  CONTINUE
C   PERFORM N-1 SIMILARITY TRANSFORMATIONS
C   DO 23 NR=2,NM1
C   NRM1=NR-1
C   VR=0.0
C   TAU(1,NR)=0.0
C   TAU(2,NR)=0.0
C   TAU(2,1)=0.0
C   DO 24 L=NR,N
24  VR=VR+A(1,L,NRM1)**2+A(2,L,NRM1)**2
C   IF (GAMMA*TOLER**2-VR) 25,23,23
25  IF (DABS(A(1,NR,NRM1))+DABS(A(2,NR,NRM1))) 27,26,27
26  A(1,NR,NRM1)=DSQRT(VR)
C   DELTA=VR
C   TAU(1,1)=-A(1,NR,NRM1)
C   GO TO 28
27  ROOT=DSQRT((A(1,NR,NRM1)**2+A(2,NR,NRM1)**2)*VR)
C   DELTA=VR+ROOT
C   RATIO=VR/ROOT
C   TAU(1,1)=-RATIO*A(1,NR,NRM1)
C   TAU(2,1)=RATIO*A(2,NR,NRM1)
C   A(1,NR,NRM1)=(RATIO+1.0)*A(1,NR,NRM1)
C   A(2,NR,NRM1)=(RATIO+1.0)*A(2,NR,NRM1)
28  CONTINUE
C   THE MATRIX TO BE USED IN THE SIMILARITY TRANSFORMATION HAS BEEN
C   DETERMINED. THE TRANSFORMATION FOLLOWS.
C   DO 300 J=NR,N
C   TAU(1,J)=A(1,J,NRM1)/DELTA
C   TAU(2,J)=A(2,J,NRM1)/DELTA
C   C(J)=0.0
C   B(J)=0.0
C   DO 30 L=NR,J
C   C(J)=C(J)+A(1,J,L)*A(1,L,NRM1)-A(2,J,L)*A(2,L,NRM1)
30  B(J)=B(J)+A(1,J,L)*A(2,L,NRM1)+A(2,J,L)*A(1,L,NRM1)
C   JP1=J+1
C   IF (JP1.GT.N) GO TO 300
C   DO 29 L=JP1,N
C   C(J)=C(J)+A(1,L,J)*A(1,L,NRM1)+A(2,L,J)*A(2,L,NRM1)
29  B(J)=B(J)+A(1,L,J)*A(2,L,NRM1)-A(2,L,J)*A(1,L,NRM1)
300  CONTINUE
C   RHO=0.0

```



```

DO 31 L=NR,N
31  RHO=RHO+C(L)*TAU(1,L)+B(L)*TAU(2,L)
    DO 32 I=NR,N
    DO 32 J=NR,I
    X1=TAU(1,I)*C(J)+TAU(2,I)*B(J)
    X2=TAU(2,I)*C(J)-TAU(1,I)*B(J)
    Q1=C(I)-RHO*A(1,I,NRM1)
    Q2=B(I)-RHO*A(2,I,NRM1)
    T1=Q1*TAU(1,J)+Q2*TAU(2,J)
    T2=Q2*TAU(1,J)-Q1*TAU(2,J)
    A(1,I,J)=A(1,I,J)-X1-T1
    A(2,I,J)=A(2,I,J)-X2-T2
32  CONTINUE
    TAU(1,NR)=TAU(1,1)
    TAU(2,NR)=TAU(2,1)
23  CONTINUE
C   THE MATRIX HAS BEEN REDUCED TO TRIDIAGONAL HERMITIAN FORM. THE
C   SUBDIAGONAL HAS BEEN TEMPORARILY STORED IN VECTOR TAU
C   STORE THE DIAGONAL OF THE REDUCED MATRIX IN C.
DO 33 I=1,N
33  C(I)=A(1,I,I)
C   PERFORM THE DIAGONAL UNITARY SIMILARITY
IF (NM1) 35,35,34
34  TAU(1,N)=A(1,N,NM1)
    TAU(2,N)=-A(2,N,NM1)
35  TAU(1,1)=1.0
    TAU(2,1)=0.0
    B(N)=0.0
    TESTBB=DSQRT(GAMMA)*TOLER
C   CALCULATE SUBDIAGONAL B OF THE REAL SUMMETRIC TRIDIAGONAL
C   MATRIX. CALCULATE TAU, THE DIAGONAL OF THE DIAGONAL
C   UNITARY MATRIX T.
DO 36 I=2,N
    IM1=I-1
    BB=DSQRT(TAU(1,I)**2+TAU(2,I)**2)
    B(IM1)=BB
    IF (TESTBB-BB) 38,37,37
37  TAU(1,I)=1.0
    TAU(2,I)=0.0
    BB=1.0
38  TT1=TAU(1,I)*TAU(1,IM1)-TAU(2,I)*TAU(2,IM1)
    TT2=TAU(1,I)*TAU(2,IM1)+TAU(2,I)*TAU(1,IM1)
    TAU(1,I)=TT1/BB
    TAU(2,I)=TT2/BB
36  CONTINUE
    RETURN
    END
C+++++
C   COMPILER DOUBLE PRECISION
C
C
C   SUBROUTINE CHANGE(ND,N,B,A,TAU,TOLER,Z1,Z2)
C
C   AS INPUT, THE REAL VECTOR B CONTAINS THE LOWER SUBDIAGONAL
C   OF THE REDUCED MATRIX. THE LOWER TRIANGLE OF MATRIX A CONTAINS
C   THE DIAGONAL OF THE UNITARY MATRIX T. TOLER IS CALCULATED
C   BY CODIAG. THE COLUMNS OF THE INPUT MATRIX Z1 ARE THE
C   EIGENVECTORS OBTAINED FROM EIGEN. THE OUTPUT Z1(K,J) AND
C   Z2(K,J) ARE COMPONENT K OF THE EIGENVECTOR NUMBER J
C   OF THE STARTING MATRIX.
C   TRANSFORM THE EIGENVECTORS OF THE REAL SYMMETRIC TRIDIAGONAL

```

```

CIC MATRIX TO THOSE OF THE HERMITIAN TRIDIAGONAL MATRIX OBTAINED
C BY THE METHOD OF HOUSEHOLDER.
C
C
      IMPLICIT REAL*8(A-H,O-Z)
      DIMENSION B(20),A(2,ND,ND),TAU(2,1500),Z1(ND,ND),Z2(ND,ND),
1 ALPHA(2,1500)
      GAMMA=1.0E-22
      DO 31 K=1,N
        DO 31 J=1,N
31      Z2(K,J)=0.0
      M1=N
      DO 41 J=2,N
        DO 41 K=1,M1
          P1=Z1(J,K)*TAU(1,J)
          P2=-Z1(J,K)*TAU(2,J)
          Z1(J,K)=P1
41      Z2(J,K)=P2
C
C RECOVER THE HOUSEHOLDER MATRICES IN REVERSE ORDER.
DO 49 L=3,N
  NR=N-L+2
  NRM1=NR-1
  IF (GAMMA*TOLER**2-B(NRM1)) 43,49,49
43  DELTA=B(NRM1)*DSQRT(A(1,NR,NRM1)**2+A(2,NR,NRM1)**2)
  DO 44 J=1,M1
    ALPHA(1,J)=0.0
    ALPHA(2,J)=0.0
    DO 45 K=NR,N
      ALPHA(1,J)=ALPHA(1,J)+A(1,K,NRM1)
1      *Z1(K,J)+A(2,K,NRM1)*Z2(K,J)
45      ALPHA(2,J)=ALPHA(2,J)-A(2,K,NRM1)
1      *Z1(K,J)+A(1,K,NRM1)*Z2(K,J)
    ALPHA(1,J)=ALPHA(1,J)/DELTA
44      ALPHA(2,J)=ALPHA(2,J)/DELTA
C
C TRANSFORM THE EIGENVECTORS FROM STAGE NR TO STAGE NR-1
DO 48 J=1,M1
  DO 42 K=NR,N
    Z1(K,J)=Z1(K,J)-A(1,K,NRM1)
1    *ALPHA(1,J)+A(2,K,NRM1)*ALPHA(2,J)
    Z2(K,J)=Z2(K,J)-A(1,K,NRM1)
1    *ALPHA(2,J)-A(2,K,NRM1)*ALPHA(1,J)
42  CONTINUE
48  CONTINUE
49  CONTINUE
  RETURN
  END
C+++++

```